

ZUR ALKALOIDBILDUNG IN  
PAPAYER SOMNIFERUM L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

MECHTHILD JUPE

aus Gronau/Alfeld

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



# ZUR ALKALOIDBILDUNG IN PAPAVER SOMNIFERUM L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

MECHTHILD JUPE

aus Gronau/Alfeld

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

|                                 |                     |
|---------------------------------|---------------------|
| als Dissertation angenommen am: | 26.10.1977          |
| Tag der mündlichen Prüfung:am:  | 26.10.1977          |
| Berichterstatter:               | Prof. Dr. M. Wichtl |
| Mitberichterstatter:            | Prof. Dr. P.H. List |

Die vorliegende Arbeit entstand am  
Institut für Pharmazeutische Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
unter Leitung von

Herrn Professor Dr. M. Wichtl

dem ich für seine Förderung und  
Unterstützung herzlich danken möchte.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                    | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung und Problemstellung                                                                                                  | 1     |
| 1.1. Aus der Geschichte des Schlafmohns                                                                                            | 1     |
| 1.2. Neuere Arbeiten zur Alkaloidbildung<br>in <i>Papaver somniferum</i>                                                           | 2     |
| 1.3. Ziel der vorliegenden Arbeit                                                                                                  | 8     |
| 2. Die Entwicklung des Milchröhrensystems<br>vom Keimlingsstadium bis zur<br>fruchtenden Pflanze                                   | 9     |
| 3. Die Veränderungen im Alkaloidgehalt der<br>Laubblätter während einer Vegetations-<br>Periode, aufgezeigt an den Hauptalkaloiden | 26    |
| 4. Ergänzende Untersuchungen über den Alkaloid=<br>gehalt von Keimpflanzen, Samen und Latex,<br>aufgezeigt an den Hauptalkaloiden  | 31    |
| 5. Der Alkaloidgehalt von Blattläusen auf<br><i>Papaver somniferum</i> und seine Bedeutung                                         | 37    |
| 6. Experimenteller Teil                                                                                                            | 43    |
| 6.1. Herkunft und morphologische Merkmale<br>der Versuchspflanzen                                                                  | 43    |
| 6.2. Aufbereitung von Pflanzen, Samen, Latex<br>und tierischem Material zur phytochemischen<br>Untersuchung                        | 43    |
| 6.3. Extraktion und Weiterverarbeitung                                                                                             | 45    |
| 6.4. Qualitative und quantitative<br>Dünnschichtchromatographie                                                                    | 46    |
| 6.5. TAS-Verfahren nach STAHL                                                                                                      | 51    |
| 6.6. Mikrotechniken und Mikroskopverfahren                                                                                         | 52    |
| 6.7. Abbildungen                                                                                                                   | 66    |

## 7. Zusammenfassung

67

## 8. Literaturverzeichnis

71

## 1. Einleitung und Problemstellung

### 1.1. Aus der Geschichte des Schlafmohns (*Papaver somniferum* L.)

*Papaver somniferum*, der Schlafmohn, ist eine der ältesten Arznei- und Nutzpflanzen, die wir kennen. Nach Mohnkapselfunden aus Pfahlbauten wurde Mohn schon vor mehr als 2000 Jahren in Mitteleuropa kultiviert. Als Heimat des Schlafmohns kann der östliche Mittelmeerraum angenommen werden. Von dort aus wurde die Pflanze nach Persien, Indien und China verbreitet.

Die vermutlich älteste schriftliche Aufzeichnung über den Schlafmohn findet sich in der Tontafel-Bibliothek des assyrischen Königs ASSURBANIPAL (669-626 v. Chr.), worin über Opium als Mittel zur Schmerzlinderung berichtet wird. THEOPHRASTOS von Eresos (gest. 287 v. Chr.) erwähnte in seiner "Pflanzengeschichte" den Milchsaftfluß von Mohnpflanzen, der nach Anritzen der Kapsel entsteht. SCRIBONIUS LARGOS (40 n. Chr.) unterschied in seinen "Compositiones Medicamentorum" Opium von Mekonium. Mit Opium wurde der Milchsaft des Schlafmohns bezeichnet; unter Mekonium verstand er den schwächer wirksamen Preßsaft aus den Blättern oder der ganzen blühenden Pflanze. DIOSKURIDES (50 n. Chr.) beschrieb ausführlich die Herstellung von Opium durch Anritzen der unreifen Kapseln und das Sammeln des austretenden Milchsafts.

In Mitteleuropa wurde der Schlafmohn als Arzneipflanze erst relativ spät in der Medizin benutzt. Das Kraut, die Früchte (auch der Samen), Opium und Zubereitungen daraus waren bekannt und wurden als Narkotikum und Analgetikum angewandt. (APOTHEKE LÜNEBURG 1475, TAXE WORMS 1582, APOTHEKE BRAUNSCHWEIG 1666, PHARMAKOPOEA WÜRTEMBERG 1741) Auch erhebliche Nebenwirkungen bis hin zu tödlichen Vergiftungen, die auf Opiumalkaloide zurückzuführen waren, wurden schon damals beobachtet und beschrieben.

Der Apotheker FRIEDRICH WILHELM SERTÜRNER (1783-1841) setzte mit der Entdeckung und Isolierung des Morphins den Grundstein zur heutigen Alkaloidchemie. Auf der Suche nach dem "wirksamen Prinzip einer pflanzlichen Droge" fand er unter den basisch reagierenden Stoffen das Hauptalkaloid Morphin, das seit dieser Zeit nicht nur als Reinsubstanz Anwendung fand, sondern auch Ausgangspunkt für die sich rasch entwickelnde Alkaloidchemie wurde.

## 1.2. Neuere Arbeiten zur Alkaloidbildung in *Papaver somniferum*

Bis in unsere Zeit sind Opiumalkaloide nicht zu ersetzende Substanzen in der Medizin geblieben. Es ist daher eigentlich überraschend, daß sich ein so unrationelles Verfahren wie die Opiumgewinnung bis in unsere Tage behaupten konnte; denn beim Anritzen der unreifen Mohnkapsel wird jeweils nur ein Bruchteil des tatsächlich von der Pflanze gebildeten Milchsaftes gewonnen. Schon TSCHIRCH ( 1 ) stellte die Frage, ob es nicht bessere Wege gäbe, um die wertvollen Opiumalkaloide zu gewinnen. Im gleichen Zusammenhang werden von ihm auch die unterschiedlichen Alkaloidgehalte und Morphinanteile in Opiumproben verschiedener Herkünfte erwähnt, eine Frage, die mit zunehmender Verbesserung analytischer Methoden immer mehr Gewicht erhielt. Als gesichert gilt heute, daß sowohl der Morphingehalt als auch die Menge an Nebenalkaloiden in sehr beträchtlicher Breite Schwankungen unterliegen. Darüber und auch über erste biogenetische Fragestellungen haben HEEGER und POETHKE ( 2 ) 1948 zusammenfassend berichtet. Mit der Einführung der Papier- und vor allem der Dünnschichtchromatographie (1950-1960) bekam man Verfahren in die Hand, die viel sicherer als bisher und auch rascher einen Einblick in die Zusammensetzung des Alkaloidgemisches erlaubten. Da die Dünnschichtchromatographie zudem zuließ, Trennungen im Mikrogrammbereich durchzuführen, konnte auch die Frage der Alkaloidbildung in bezug auf Vorstufen und Bildungsort mit erheblich besserer Genauigkeit angegangen werden.

Aus der Fülle von Arbeiten über die Alkaloide von *Papaver somniferum* und ihre Biogenese seien in der Folge nur die wichtigsten zitiert, um die Problemstellung der vorliegenden Dissertation besser verständlich zu machen.

Einer der ersten, der sich mit solchen Problemen befaßte, war der Holländer KERBOSCH ( 3 ), der schon 1910 in seiner Arbeit "Bildung und Verbreitung einiger Alkaloide in Papaver somniferum L." daranging, (zitiert aus seiner Arbeit:) "... zu erforschen, an welcher Stelle und in welchem Stadium der Entwicklung die Hauptopiumalkaloide gebildet werden, wenn möglich mit Berücksichtigung der Gewichtsverhältnisse."

Er hat für seine Untersuchungen nicht die damals gebräuchlichen Farbreaktionen verwendet -deren unsicheren Ausfall bei Anwesenheit schon geringer Mengen Begleitsubstanz er zu Recht kritisiert-, sondern benutzte die ihm besser erscheinenden mikrokristallinen Fällungen. Von seinen Ergebnissen verdienen einige erwähnt zu werden, weil sie Fragen berühren, die auch in dieser Dissertation behandelt werden. KERBOSCH stellt unter anderem fest, daß die Samen "eine Spur Narkotin und amorphes Alkaloid" enthalten. TSCHIRCH hat später in seinem Handbuch der Pharmakognosie die Meinung vertreten, daß das Vorkommen von Alkaloiden im Mohnsamen zu Unrecht behauptet wird. Sehr bemerkenswert ist die Aussage von KERBOSCH, daß schon drei Tage nach der Keimung die Menge an Noscapin stark ansteigt und daß "... ich Kodein schon in der Pflanze nachweisen konnte, bevor noch Morphin zu finden war." Hier ist, mehr als 50 Jahre vor der endgültigen Klärung der Biogenese des Morphins, schon ein wichtiger Teilschritt richtig beobachtet worden. Freilich ist die Arbeit von KERBOSCH nicht frei von Irrtümern, aber er hat mit den damals zur Verfügung stehenden Mitteln wesentliche Einblicke gewonnen, wenn sie auch heute anders formuliert werden ("... Narkotin ... ist aus Eiweiß entstanden.."). Es hat dann ungefähr 40 Jahre gedauert, bis man die Frage der Alkaloidbildung wieder aufgegriffen hat.

1951 untersuchten POETHKE und ARNOLD ( 4 ) den Morphingehalt der Mohnpflanze im Verlauf einer Vegetationsperiode. Sie bestätigten, daß auch unter mitteleuropäischen Klimabedingungen in der Mohnpflanze Alkaloide gebildet werden.

Einige Jahre später hat PFEIFER ( 5 ) zahlreiche Arten der Gattung Papaver auf Alkaloide untersucht. Er befaßte sich vor allem mit der Weiterentwicklung analytischer Methoden. 1958 berichtete er über ein Verfahren zur quantitativen Erfassung der wichtigsten Mohnalkaloide (Morphin, Codein, Thebain, Narcein, Papaverin, Noscapin, Narkotolin und Kotarnolin). Die Alkaloide werden bei verschiedenen pH-Werten extrahiert und anschließend photometrisch oder polarographisch bestimmt.

TETENYI, LÖRINCZ und SZABO ( 6 ) untersuchten 1961 Papaverhybriden (Papaver somniferum X Papaver orientale) und stellten bei Kreuzungsversuchen fest, daß in der F<sub>1</sub>-Generation das Alkaloidspektrum nur qualitativ den Elternpflanzen entspricht. Sie beschrieben auch den Einfluß von Klima und Witterungsverhältnissen auf das Alkaloidspektrum.

Im selben Jahr 1961 berichteten PFEIFER und HEYDENREICH ( 7 ) über das Alkaloidspektrum von Keimpflanzen. Diese Arbeit sollte der Aufklärung des Biosyntheseweges des Morphins dienen. PFEIFER und HEYDENREICH fanden, daß die Alkaloidbildung bereits bald nach der Keimung einsetzt. Während der ersten 5-6 Wochen der Vegetationsperiode liegt dabei in der Wurzel der Gehalt der wichtigsten Nebenalkaloide weit über dem Morphingehalt; auffallend ist vor allem der hohe Thebaingehalt in diesem Stadium. So vermuteten PFEIFER und HEYDENREICH, daß die Biosynthese des Morphins über einen Prekursor (Tyrosin oder Phenylalanin) über Norlaunosolin - Thebain - Codein zu Morphin verläuft.

1964 untersuchte NEUBAUER ( 8 ) an drei Stämmen von Papaver somniferum die Verteilung von Morphin, Codein, Thebain und Narkotolin in Wurzeln, Blättern, Stengeln und Kapseln während einer Vegetationsperiode. Er benutzte zur qualitativen Bestimmung aller Alkaloide und zum halbquantitativen Abschätzen von Codein und Narkotolin die Dünnschichtchromatographie. In Biogeneseversuchen konnte er nach Fütterung von <sup>14</sup>C-markierten Alkaloiden die Fähigkeit der Mohnkapsel zur Demethylierung des Codeins zum Morphin nachweisen.

1966 (9, 10 ) gab PFEIFER eine Übersicht über die Alkaloidgruppen der Gattung Papaver und deren papier- und dünnschichtchromatographisches Verhalten. 1969 (11) berichtete er über den dünnschichtchromatographischen Nachweis von 32 weiteren, bisher nicht bekannten Alkaloiden und gab 1971 (12) eine Zusammenstellung über die bis dahin strukturell bekannten Alkaloide der Gattung Papaver heraus. Nach Untersuchung 50 verschiedener Arten und Unterarten sind nahezu 100 Alkaloide mit bekannter Konstitution nachgewiesen worden, von denen die Alkaloide der Rhoeadin- und Papaverrubingruppe anscheinend auf die Gattung Papaver beschränkt sind.

Obwohl man schon lange wußte, daß die Alkaloide hauptsächlich im Milchsaft vorkommen, hat man sich erst verhältnismäßig spät der Frage nach der Entstehung und Entwicklung der Milchröhren zugewandt. Die ersten Untersuchungen in dieser Richtung haben FAIRBAIRN und KAPOOR (13) 1960 unternommen, wobei sie die Entwicklung und Verteilung der Milchröhren des Schlafmohns in zwei wichtigen Entwicklungsphasen verfolgten, nämlich: der Entwicklung von der Blüte bis zur Kapsel und vom Samen bis zum Keimling. Untersucht wurden: Kelchblätter, Kronblätter, Staubblätter, Samenanlagen, Blütenboden und Stengel. FAIRBAIRN und KAPOOR entdeckten, daß Milchröhren immer im Phloem, nie aber im Xylem vorkommen. Die Milchröhren entstehen in jungen Geweben aus Stapeln übereinandergereihter Zellen, die sich zu Schläuchen verbinden und ein Netzwerk anastomosierender, gegliederter Milchröhren bilden. Im Keimling treten die Milchröhren erst mit Bildung grüner Gewebe auf. Milchröhren fehlen nach ihren Angaben im Samen, in Samenanlagen, jungen Keimlingen und Staubblättern. In diesen Pflanzenteilen konnten FAIRBAIRN und KAPOOR auch keine Alkaloide nachweisen. Der Nachweis der Alkaloide erfolgte mit Alkaloidreagentien, durch mikrokristalline Fällungen und mittels Papierchromatographie. FAIRBAIRN und KAPOOR kamen zu dem Schluß, daß die Anwesenheit von Alkaloiden auf das Milchröhrensystem beschränkt ist.

In den Jahren von 1967 bis 1970 beschäftigten sich FAIRBAIRN und seine Mitarbeiter eingehender mit dem Biosynthesegeschehen im Schlafmohn. FAIRBAIRN und EL-MASRY (14,15 ) verfolgten den Weg von radioaktiv markiertem Morphin nach Injektion in den Stengel dicht unterhalb der sich entwickelnden Kapsel bis in die Samenanlagen. Morphin wird im Kapselmilchsaft sofort in polare, nicht-alkaloide Substanzen gespalten. Die Spaltprodukte werden relativ schnell aus dem Latex entfernt und ins Perikarp und in die Embryonen transportiert. Hier werden die Spaltprodukte nach einiger Zeit wieder in schwerer lösliche Substanzen umgewandelt. Im Mohnsamen entdeckten FAIRBAIRN und EL-MASRY höhermolekulare als "bound alkaloids" bezeichnete Stoffe, die nach Säurehydrolyse und Pepsineinwirkung in alkaloid-ähnliche Substanzen zerfielen. Eines dieser Bruchstücke konnte als Codein identifiziert werden; Morphin selbst wurde nicht gefunden, nur Substanzen mit naher Verwandtschaft zum Morphin, wie aus Dünnschichtchromatogrammen und UV-Spektren hervorging. Wurde radioaktiv markiertes Morphin dem Kapsel-Latex zugeführt, so erschienen im Embryo und daraufhin auch im reifen Samen markierte "bound alkaloids", die bei der Keimung dieser Samen zu radioaktiv markierten, alkaloid-ähnlichen Strukturen abgebaut wurden. FAIRBAIRN und EL-MASRY führten darauf eine Untersuchung durch, die Aufschluß geben sollte, ob diese Substanzen für die Lebensfähigkeit der Samen von Bedeutung sind. Es stellte sich heraus, daß Samen, die sich in einer Kapsel entwickelt hatten, der man in kritischen Entwicklungsphasen den Latex entzogen hatte, Defekte in der Wurzelhaar- und Chlorophyllbildung der keimenden Pflanze zeigten. Durch verdünnte Alkaloidlösungen konnte diese Fehlentwicklung zumindest teilweise korrigiert werden. FAIRBAIRN und EL-MASRY stellten auch Betrachtungen über die pharmakologischen Aspekte der "bound alkaloids" (nach Genuß von Mohnsamen) an. Mit diesen Arbeiten stellte FAIRBAIRN selbst seine These in Frage, daß die Anwesenheit der Opiumalkaloide auf das Milchröhrensystem des Schlafmohns beschränkt ist.

Sehr jungen Datums sind schließlich Untersuchungen zum intrazellulären Mechanismus der Alkaloidbiosynthese. So isolierten 1970 FAIRBAIRN und DJOTE (16) eine Latexfraktion, die elektro=nenmikroskopisch darstellbare Zellorganellen enthielt, in der alle, für die Morphinbiosynthese aus DOPA notwendigen Enzyme enthalten waren. Auch ANTOUN und ROBERTS (17,18 ) haben kürz=lich über verschiedene Enzymaktivitäten im Milchsafte von Papaver somniferum berichtet.

### 1.3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Angeregt durch FAIRBAIRN'S und KAPOOR'S Arbeiten zur Milchröhrenentwicklung erschien mir eine weiterführende mikroskopische Untersuchung wichtig aus folgenden Gründen:

Es gibt immer noch zu wenig Aussagen über ein so wichtiges Transportsystem und einen so offensichtlichen Kumulationsort der Papaveralkaloide. FAIRBAIRN und KAPOOR behandeln nur zwei Ausschnitte aus der Vegetationsperiode, eine Übersicht über die Entwicklung einer vollen Vegetationsperiode steht noch aus. Die Abbildungen in ihrer Arbeit lassen sich erheblich verbessern durch veränderte Mikrotechniken, verschiedene Mikroskopierverfahren und fortgeschrittene Phototechnik.

Zugleich sollte eine phytochemische Untersuchung der einzelnen Laubblätter erfolgen, (in vorangegangenen Arbeiten wurden die Blätter stets als Gesamtheit analysiert), um einen Überblick über die Änderungen der Gehalte der Hauptalkaloide (Morphin, Codein, Papaverin und Noscapin) im Verlaufe einer Vegetationsperiode zu erhalten. Um Einblick in ein solch komplexes Biosynthesegeschehen -wie das der Alkaloidbildung- haben zu können, ist es sicher wichtig, auch geringe Schwankungen -wie die von Blatt zu Blatt- zu beobachten.

Da die Aussage von FAIRBAIRN und KAPOOR, nach der die Anwesenheit der Alkaloide auf das Milchröhrensystem beschränkt ist, sehr umstritten ist, sollte auch diese Frage nochmals gesondert überprüft werden.

## 2. Die Entwicklung des Milchröhrensystems vom Keimlingsstadium bis zur fruchtenden Pflanze

Die Milchröhrenentwicklung wurde vom Keimpflanzenstadium an während einer ganzen Vegetationsperiode in der Sproßachse beobachtet. Das Milchröhrensystem befindet sich in der Pflanze unmittelbar an die Siebröhren des kollateralen Leitbündels angrenzend. Bei *Papaver somniferum* liegen die Leitbündel als Ring an der Peripherie der Sproßachse; das einzelne Leitbündel ist so aufgebaut, daß vom Mittelpunkt der Sproßachse zur Peripherie aufeinanderfolgen: Xylem, je nach Entwicklungsstadium mehr oder weniger deutlich zu erkennen ein schmaler Ring von Kambiumzellschichten und die Siebröhren mit Geleitzellen; denen schließen sich Milchröhren und Sklerenchymfasern an.

Die Bearbeitung der Milchröhren gestaltete sich aus zwei Gründen als äußerst schwierig. Das System der Milchröhren ist sehr labil und empfindlich vor allem in sehr jungen Geweben. Die herkömmlichen Methoden der botanischen Mikrotechnik versagen hier bei der Bearbeitung, wie die einfachen Schnittmethoden der Handschnitte und des Paraffinverfahrens bei Mikrotomschnitten. Auch die einfachen Färbeverfahren (mit Safranin, Lichtgrün, Fast Green) lassen sich zur Kontrastierung der Milchröhrenwände nicht anwenden. Es mußten daher spezielle Bearbeitungsmethoden gefunden werden. Die Gefriermikrotomie mit einer Spezialeinbettung wurde schließlich als optimales Schneideverfahren ausgearbeitet. (Älteres, fixiertes Pflanzenmaterial kann auch mit der Hand geschnitten werden.) Die auf diese Weise entstandenen Schnitte sind jedoch so dünn, daß sie unter dem Lichtmikroskop nur sehr flache, kontrastarme Bilder liefern. Erst nach Versuchen mit verschiedenen Mikroskopverfahren (UV-Licht, polarisiertes Licht) konnte mit der INKO-Mikroskopie (siehe 6.6. Interferenz-Kontrast-Mikroskopie) ein Verfahren angewandt werden, daß auch bei dünnen Schnitten ein plastisches, kontrastreiches Bild liefert. In nachfolgenden Photos werden beide Verfahren (Lichtmikroskopie und INKO-Mikroskopie) einander gegenübergestellt.

Zur Kontrastierung der Milchröhren vom umliegenden Gewebe wurde aus zahlreichen Färbeversuchen nur ein Verfahren -die ZACH-Färbung- als erfolgreich herausgefunden. Dieses Verfahren dient ursprünglich zur Sichtbarmachung von Kallosebelägen, ich fand jedoch heraus, daß es sich zur selektiven Anfärbung von Milchröhren und benachbarten Geweben sehr gut eignet (siehe Abb. 11, 16-20).

Die Vorgänge und Entwicklungen, die im folgenden beschrieben werden, sind aus mehreren hundert Handschnitten, Mikrotom- und Gefriermikrotomschnitten ausgewertet worden. Die wichtigsten Stadien sind sowohl durch Photographien als auch durch Zeichnungen belegt. Mit Zeichnungen können bestimmte Strukturen besonders hervorgehoben werden, oder Einzelheiten aus verschiedenen optischen Ebenen in einer Ebene dargestellt werden; demgegenüber haben Mikrophotographien den Vorteil, ein naturgetreues Abbild des Objektes zu geben.

#### Abb. 1-4

Bei Untersuchungen von Keimpflanzen konnten die Beobachtungen von FAIRBAIRN und KAPOOR (13) und ESAU (19) bestätigt werden, daß die Milchröhren aus Lagen übereinandergereihter Zellen entstehen. Im Leitbündel von Keimpflanzen sind die Gefäße bereits im Alter von zwei Tagen ausdifferenziert; die angrenzenden Zellschichten, aus denen später Siebröhren, Milchröhren und Sklerenchymfasern gebildet werden, erscheinen noch als Lagen schmaler, tangential gestreckter Zellen. Die Anzahl der Gefäße ist in diesem Alter noch sehr gering. Auf den Abbildungen 1 und 4 ist sogar jeweils nur ein intaktes Gefäß zu erkennen. Es wird deutlich sichtbar, wie empfindlich das Gewebe dieser jungen Pflanzen ist, selbst nach dem sehr schonenden Verfahren der Gefriermikrotomie reißt das Gewebe noch stellenweise ein, wie auf den Abbildungen zu erkennen ist.

#### Abb. 5-11

Die Differenzierung der Milchröhren geschieht folgendermaßen: die Zellen strecken sich noch mehr in der Längsrichtung und die Querwände lösen sich auf, sodaß langgestreckte Schläuche entstehen. Die Längswände weichen zum Teil auseinander, zum andern werden auch sie aufgelöst, sodaß das fertig ausgebildete Milchröhrensystem ein Netzwerk fusionierender Röhren bildet.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die beginnende Differenzierung der Zellagen in der Nähe der Gefäße. Ein Auseinanderweichen und Auflösen der Längswände ist zu beobachten. Die Querwände der Zellen, die von den Gefäßen weiter entfernt sind, sind bereits zum größten Teil aufgelöst.

Die Abbildungen 7 und 9 zeigen Querschnittsbilder der Sproßachse von 5 Wochen alten Pflanzen. Auf Abbildung 7 ist zu sehen, daß sich im Querschnitt Milchröhren und Siebröhren noch nicht wesentlich durch unterschiedliche Zellwandstärke oder unterschiedlichen Zelldurchmesser voneinander unterscheiden. Abbildung 8 zeigt als Übersicht die Lage der Leitbündel im Sproßachsenquerschnitt.

In Abbildung 11 heben AFE-Fixierung und ZACH-Färbung die Milchröhren besonders hervor. Deutlich erkennbar ist auch der koagulierte Milchröhreninhalt. Das Netzwerk der Milchröhren ist bereits ausgebildet.

#### Abb. 12-24

Im Verlaufe der Vegetationsperiode nehmen Durchmesser und Zellwandstärke der Milchröhren noch zu; am Ende der Vegetationsperiode sind Milchröhren im Querschnitt deutlich größer und haben dickere Zellwände als Siebröhren. Demgegenüber bleibt die Anzahl der einzelnen Milchröhren nach Ausdifferenzierung des Milchröhrensystems bis zum Ende der Vegetationsperiode nahezu konstant.

Diese Entwicklung läßt sich besser an Querschnitten sichtbar machen als an Längsschnitten. Abbildung 18 zeigt deutlich, daß Milchröhren einen größeren Durchmesser haben als Siebröhren. In Abbildung 20 sind die den Siebröhren gegenüber verdickten Zellwände der Milchgut zu erkennen.

Abbildung 21 zeigt einen Ausschnitt des voll ausgebildeten Milchröhrensystems in der 11. Woche der Vegetationsperiode, unter dem Lichtmikroskop aufgenommen; demgegenüber zeigt Abbildung 24 einen

ähnlichen Ausschnitt, jedoch am Ende der Vegetationsperiode; die Pflanzen sind zu diesem Zeitpunkt welk, die Latexproduktion hat nachgelassen und die Struktur der Milchröhren läßt sich besser mittels INKO-Mikroskopie sichtbar machen.

#### Abb. 25-26

Diese Abbildungen zeigen eine Besonderheit im Leitbündelsystem von *Papaver somniferum*. Die Pflanzen haben zusätzlich zu den Siebplatten, die als Querwände in die Siebröhren eingelassen sind, eine Anzahl kleiner Siebfelder, die sich in den Längswänden der Siebröhren befinden. (Diese Siebfelder werden sichtbar, wenn als Aufhellungsmittel Chloralhydrat angewandt wird; siehe 6.6.)

Gegenüber der Arbeit von FAIRBAIRN und KAPOOR (13), die während zweier Entwicklungsphasen des Schlafmohns die Lage und Verteilung der Milchröhren beobachteten (der Entwicklung vom Samen zum Keimling und von der Blüte zur Kapsel), untersuchte ich Differenzierung und Entwicklung der Milchröhren während der gesamten Vegetationsperiode und hielt die Veränderungen, die das Milchröhrensystem während dieser Zeit durchlief, in Photographien und Zeichnungen fest. Dabei stellte ich fest, daß die Differenzierung des Röhrensystems schon nach 4 bis 5 Wochen abgeschlossen ist. Nach diesem Zeitpunkt findet kein Auflösen von Wandmaterial oder ein Auseinanderweichen von Zellwänden mehr statt, die Anzahl der einzelnen Milchröhren im System ist damit festgelegt. Bis zur Blütezeit verändert sich das Milchröhrensystem nur insofern, daß der Durchmesser der Röhren weiter wird (Siebröhren machen diesen Wachstumsprozeß nicht in dem Maße mit wie Milchröhren) und die Zellwandstärke zunimmt (bei Siebröhren werden die Zellwände nicht verdickt). Bis zur 12. Woche der Vegetationsperiode ist im Milchröhrensystem Latex mikroskopisch nachweisbar, erst in der 14. Woche der Vegetationsperiode, mit dem Absterben der Pflanze, hört die Latexproduktion auf, d.h. es ist kein Latex mehr mikroskopisch nachweisbar. Neben der Entwicklung der Milchröhren ergab sich bei der Untersuchung, daß *Papaver somniferum* über eine Besonderheit im Leitbündel verfügt: die Siebröhren enthalten viele kleine, zusätzliche Siebfelder, die in die Längswände der Siebröhren eingelassen sind (siehe auch Punkt 5.).



Gefäß \_\_\_\_\_

Lagen tangential  
gestreckter

Zellen \_\_\_\_\_

Abb. 1

Abb. 2

*Papaver somniferum*:

Längsschnitt durch die Sproßachse zwei Tage alter Keimpflanzen:  
Gefriermikrotomschnitt nach Infiltration mit "Ames Embedding  
Medium"

Schnittdicke: 10,um

Interferenzkontrastmikroskopie

Aus technischen Gründen wurde bei den Photos auf  
Reproduktion verzichtet. Die vollständige Arbeit  
ist beim Dekanat des Fachbereichs Pharmazie und  
Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg  
einzusehen.

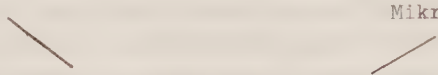
Abb. 3

Abb. 4

Gefriermikrotomschnitte  
zwei Tage alter Keimpflanzen  
von *Papaver somniferum*

Lichtmikroskopie

Interferenzkontrast-  
Mikroskopie



Gegenüberstellung

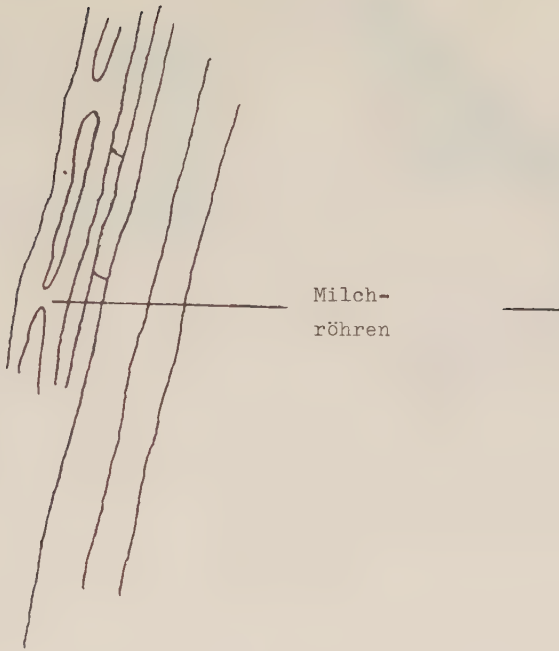


Abb. 5

Abb. 6

Längsschnitt der Sproßachse einer vier Wochen alten Treibhauspflanze  
Gefriermikrotomschnitt



Querschnitt durch die  
Sproßachse einer fünf  
Wochen alten Freiland-  
Pflanze

Handschnitt von AEF-  
fixiertem Material

Abb. 7

|   |                                                                                                  |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| } | Abb. 8                                                                                           |
| } | Sklerenchymfasern                                                                                |
| } | Milchröhren                                                                                      |
| } | Siebröhren                                                                                       |
| } | Kambiumzone                                                                                      |
| } | Gefäße                                                                                           |
| } | (Milchröhren hier und auf nach-<br>folgenden Abbildungen durch<br>Tuschezeichnung hervorgehoben) |
| } | Abb. 9                                                                                           |

tangentialer Längsschnitt  
durch die Sproßachse einer  
fünf Wochen alten Pflanze

Aufsicht auf die Gefäße  
und darunter liegende  
Milchröhren  
(optischer Schnitt)

Abb. 10

Milchröhren  
erkennbar an  
ihrem koagulierten  
Inhalt

Färbung nach  
"Zach"

Abb. 11

Sklerenchymfasern

Milchröhren

Siebröhren

Gefäße

Abb. 12

Abb. 13

Querschnitt durch die  
Sproßachse einer zehn  
Wochen alten Freiland-  
pflanze

Leitbündel



Querschnitt durch die  
Sproßachse einer zehn  
Wochen alten Freiland-  
pflanze

vergrößerte Ausschnitte  
aus dem Leitbündel

Abb. 14

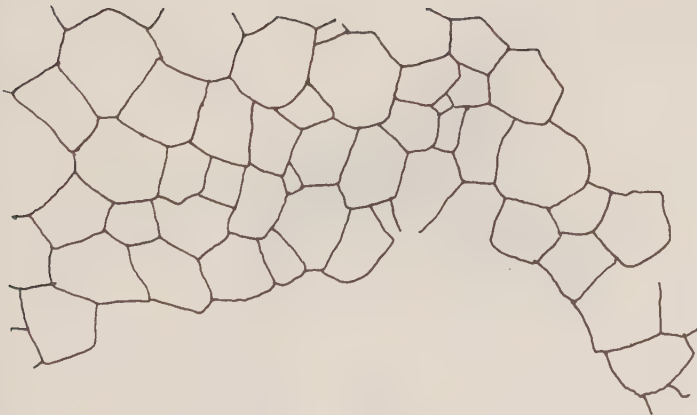


Abb. 15

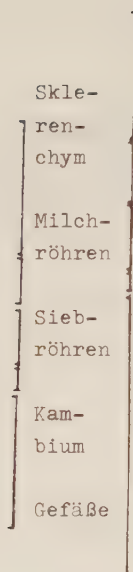
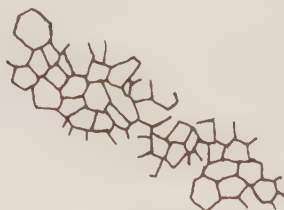


Abb. 16

Abb. 17

"Zach"-Färbungen an Querschnitten von Sproßachsen 10-11  
Wochen alter Freilandpflanzen

Abb. 18



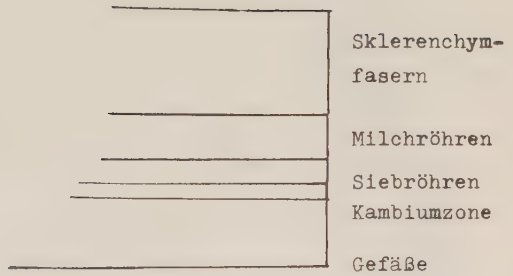
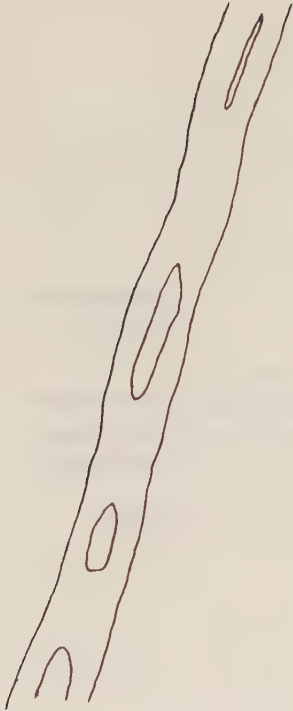


Abb. 19

"Zach"-Färbungen an Querschnitten von Sproßachsen 10-11  
Wochen alter Freilandpflanzen

Abb. 20





tangentialer Längsschnitt  
der Sproßachse einer 11  
Wochen alten Freilandpflanze

Abb. 21

Abb. 22



anastomosierende  
Milchröhren

radialer Längsschnitt durch die  
Sproßachse einer 14 Wochen alten  
Freilandpflanze

Abb. 23



Abb. 24

Interferenz-Kontrast-  
Mikroskopie

Abb. 25

Abb. 26

Kleine Siebplatten: eingelassen in die Tangentialwände von  
Siebröhren (Siebfelder)

Sichtbarmachung: durch Behandlung mit Chloralhydrat

Interferenzkontrast

Lichtmikrokopie

### 3. Die Veränderungen im Alkaloidgehalt der Laubblätter während einer Vegetationsperiode, aufgezeigt an den Hauptalkaloiden

Die Laubblätter von *Papaver somniferum* sind in dieser Hinsicht noch wenig untersucht, da sie nicht zu den Pflanzenorganen gehören, die auffallende Mengen an Alkaloiden enthalten, wie z.B. die Kapsel. In vorangegangenen Arbeiten wurden die Laubblätter stets als Gesamtheit analysiert, in dieser Arbeit werden jedoch die einzelnen Laubblätter auf die Verteilung der vier Hauptalkaloide (Morphin, Codein, Papaverin, Noscapin) in der Pflanze innerhalb einer Vegetationsperiode untersucht. Diese vier Alkaloide wurden herausgegriffen, weil sie mengenmäßig den größten Anteil der Alkaloide im Schlafmohn stellen und wegen ihrer besonderen therapeutischen Bedeutung als Analgetika, Spasmolytika und Antitussiva. Außerdem sind diese Alkaloide vergleichsweise einfach als Reinsubstanzen für die Dünnschichtchromatographie zu erhalten.

Zu dieser Untersuchung werden Freilandpflanzen herangezogen, deren Vegetationsperiode im Durchschnitt 14 Wochen dauert. Bei *Papaver somniferum* besteht die Keimpflanze aus Würzelchen, ca. 1 cm langem Stengel und zwei schmalen, lanzettförmigen Keimblättern. Zwischen der ersten und der zweiten Woche der Vegetationsperiode entwickeln sich neben den Keimblättern 2 bis 4 ganzrandige Primärblätter. Nach der zweiten Woche erscheinen die ersten Folgeblätter mit gesägtem Blattrand. In der 3. bis 4. Woche welken die Keimblätter und verschwinden. Im Bereich zwischen der 3. und der 5. Woche liegt der Zeitraum des Schossens -des ausgeprägten Streckungswachstums-. In der 5. Woche besitzt die Pflanze bis zu 12 gut entwickelte Folgeblätter; die Blütenknospe ist bereits angelegt. Mit 6 Wochen zeigt die Pflanze bis zu 15 Folgeblätter und neben der Hauptblütenknospe 1 bis mehrere Nebenknospen in den Blattachsen. Die Blütezeit liegt zwischen der 6. und der 7. Woche der Vegetationsperiode. Nach dem Abblühen, etwa von der 10. Woche an, erfolgt langsam das Welken der Laubblätter während gleichzeitig die Kapsel wächst und reift.

Pro Versuch wählte ich 10 bis 15 gleich gut entwickelte Pflanzen aus; die Laubblätter wurden von den Pflanzen abgetrennt und entsprechend ihrer Position an der Pflanze sortiert und beziffert, wobei die Bezeichnung fortlaufend von unten nach oben, d.h. von den älteren zu den jüngeren Blättern, vorgenommen wurde (F1-F15; F = Folgeblatt). Keim- und Primärblätter wurden gesondert bezeichnet (KB und PB). Die Blätter wurden anschließend getrocknet, die Analysenwerte beziehen sich auf das Trockengewicht.

Anstelle von gravimetrischen oder photometrischen Bestimmungen der Alkaloide wurde der Gehalt durch quantitative Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen mittels eines Densitometers (Spektrodensitometer SCHOEFFEL-WEISS) bestimmt. Dieses Verfahren ermöglicht es, Substanzen mit sehr verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften -wie die vorliegenden Alkaloide- in kleinen Mengen ( $\mu$ g-Bereich) nebeneinander zu bestimmen. Für die laufenden Untersuchungen während der Vegetationsperiode ist das Verfahren zudem relativ wenig aufwendig und ausreichend genau. Es ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung bis zu 0,002 Gewichtsprozent Alkaloid bezogen auf die Trockensubstanz. Der gefundene Alkaloidgehalt liegt zwischen nachweisbaren, d.h. mit bloßem Auge sichtbaren aber densitometrisch nicht meßbaren Spuren, und 0,008 %. Das Blattmaterial weist beträchtliche physiologische Schwankungen auf, deshalb wertet man erst Alkaloidgehalte von mehr als 0,003 % als wirklich charakteristischen Anstieg im Gehalt.

Im Laufe der Vegetationsperiode entnahm ich dem Versuchsfeld vor der Blütezeit in jeder Woche Pflanzenproben, während der Blüte in Abständen von 24 und 48 Stunden (da zu diesem Zeitpunkt besonders starke Veränderungen im Alkaloidgehalt vorliegen), und nach dem Abblühen alle 14 Tage.

Die Alkaloide werden im folgenden nach der Reihenfolge behandelt, wie sie nach ihren  $R_f$ -Werten im Dünnschichtchromatogramm erscheinen. Im Verlauf der Vegetationsperiode ergibt sich für die einzelnen Alkaloide folgendes Bild:

#### Für Morphin:

Keim- und Primärblätter enthalten kleine Mengen an Morphin, Primärblätter etwas mehr als Keimblätter. In den Folgeblättern ist Morphin während der Vegetationsperiode in wechselnden Mengen vorhanden, die keinen ersichtlichen jahreszeitlichen oder andersgearteten periodischen Rhythmus erkennen lassen. Eine Ausnahme bilden nur die älteren Blätter (F1 bis einschließlich F9), die zur Blütezeit zwei dicht aufeinanderfolgende Maxima aufweisen; der Morphingehalt steigt vor dem Aufblühen zum Teil erheblich an, fällt wieder ab -meist zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Blüte völlig geöffnet hat- und steigt erneut an. Es wird ersichtlich, daß Morphin kein Stoffwechselendprodukt sein kann, da es während der Vegetationsperiode in den Blättern einer raschen Metabolisierung unterliegt.

#### Für Codein:

Codein tritt in den Keimblättern nicht auf. Es ist erst von der 6. Woche der Vegetationsperiode an in den Blättern nachzuweisen. Zur Blütezeit ist vor allem in den älteren Blättern (F2-F4) ein rascher Anstieg im Gehalt zu verzeichnen. In den Blättern mittlerer Lage und mittleren Alters sinkt der Gehalt nach dem ersten Anstieg zur Blütezeit noch einmal ab (dicht vor dem Aufblühen der Pflanzen), um in der voll erblühten Pflanze sofort wieder anzusteigen. In den älteren Blättern (bis F4) sinkt der Gehalt nach der Blütezeit zum Ende der Vegetationsperiode ab; bei den jüngeren Blättern (von Blatt F6 an) ist zum Ende der Vegetationsperiode -zwischen der 12. und der 14. Woche- ein nochmaliger Abstieg im Gehalt zu verzeichnen. Da Codein im Biosynthesegeschehen die unmittelbare Vorstufe von Morphin ist, ist es eigentlich erstaunlich, daß Codein erst von der 6. Woche der Vegetationsperiode an in den Blättern auftritt, obwohl Morphin schon in Keimpflanzen nachzuweisen ist. Wahrscheinlich verläuft die Demethylierung des Codeins zum Morphin so schnell in der jungen Pflanze, daß Codein mengenmäßig nicht mehr nachweisbar ist. Auch die Verhältnisse zur Blütezeit deuten darauf hin, daß die Demethylierung sehr rasch verläuft; aus der Lage der beiden Maxima ist ersichtlich, daß die Relation zwischen Morphin und Codein

ziemlich reziprok verläuft: wenn die Menge an Morphin steigt, nimmt der Codeingehalt ab und umgekehrt (besonders gut ersichtlich an Blatt F6). Dieser Prozeß verlangsamt sich wohl erst in den letzten Wochen der Vegetationsperiode mit zunehmender Kapselreifung, wenn die Menge an Codein deutlich ansteigt.

#### Für Papaverin:

Papaverin tritt schon in den Keimblättern auf. Die Primärblätter enthalten anfangs Spuren von Papaverin, zur Blütezeit steigt der Gehalt sichtbar an. Bis auf die ältesten Blätter (bis F4 einschließlich) und die jüngsten Blätter (F12 bis F15) zeigen die übrigen Blätter einheitlich ein Maximum zum Zeitpunkt direkt vor dem Aufblühen (die Blütenknospe ist noch nickend; innerhalb von 12 Stunden wird sich die Knospe aufrichten und die Blüte öffnen). Mit dem Abblühen fällt der Gehalt entweder langsam ab, oder steigt nach raschem Abfall schnell wieder an, um bis ungefähr zur 12. Woche nur geringen Schwankungen zu unterliegen und zum Ende der Vegetationsperiode noch einmal anzusteigen.

#### Für Noscapin:

Schon die Keimblätter enthalten Spuren von Noscapin. Nach raschem Anstieg in der ersten Woche der Vegetationsperiode fällt der Gehalt in den Primärblättern wieder bis auf gerade noch wahrnehmbare Spuren ab. In den älteren Blättern (F1 bis F3) ist Noscapin in geringen Mengen erst von der 4. Woche an nachzuweisen (je älter das Blatt desto später tritt Noscapin auf).

In den jüngeren Blättern (F5 bis F14) ist Noscapin nicht vor dem Schossen (4. bis 5. Woche) nachzuweisen. Der Gehalt zeigt ein Maximum zur Blütezeit, das besonders in den jüngsten Blättern ausgeprägt ist; nach der Blüte bis ungefähr zur 10. Woche der Vegetationsperiode fällt der Gehalt ab, z. T. bis nur noch Spuren nachweisbar sind, um zum Ende der Vegetationsperiode wieder anzusteigen. Dabei enthalten die jüngeren Blätter größere Mengen an Noscapin als die älteren.

Insgesamt gesehen läßt sich über die vier Hauptalkaloide folgendes sagen:

Die Morphingesamtmenge der Laubblätter bezogen auf die volle Vegetationsperiode schwankt nicht wesentlich. Welke Blätter enthalten immer noch nennenswerte Mengen verglichen mit den Gehalten gut entwickelter Blätter während der gesamten Vegetationsperiode. Zum Teil zeigen die Blätter mit fortschreitendem Welken sogar ansteigende Mengen des Alkaloids, wie im Falle des Codeins, dieses Phänomen wird wohl durch den Wegfall demethylierender Enzyme des lebenden Blattes hervorgerufen. Die Gesamtmenge von Codein ist in den älteren Blättern (den unteren Pflanzenteilen) größer als in den jüngeren Blättern.

Noscapin und Papaverin zeigen im Laufe der Vegetationsperiode ein stetiges Ansteigen der Gesamtmenge in der Pflanze.

Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN

6

4

2

1

F1

1

PB

1

1

1

1

1

1

1

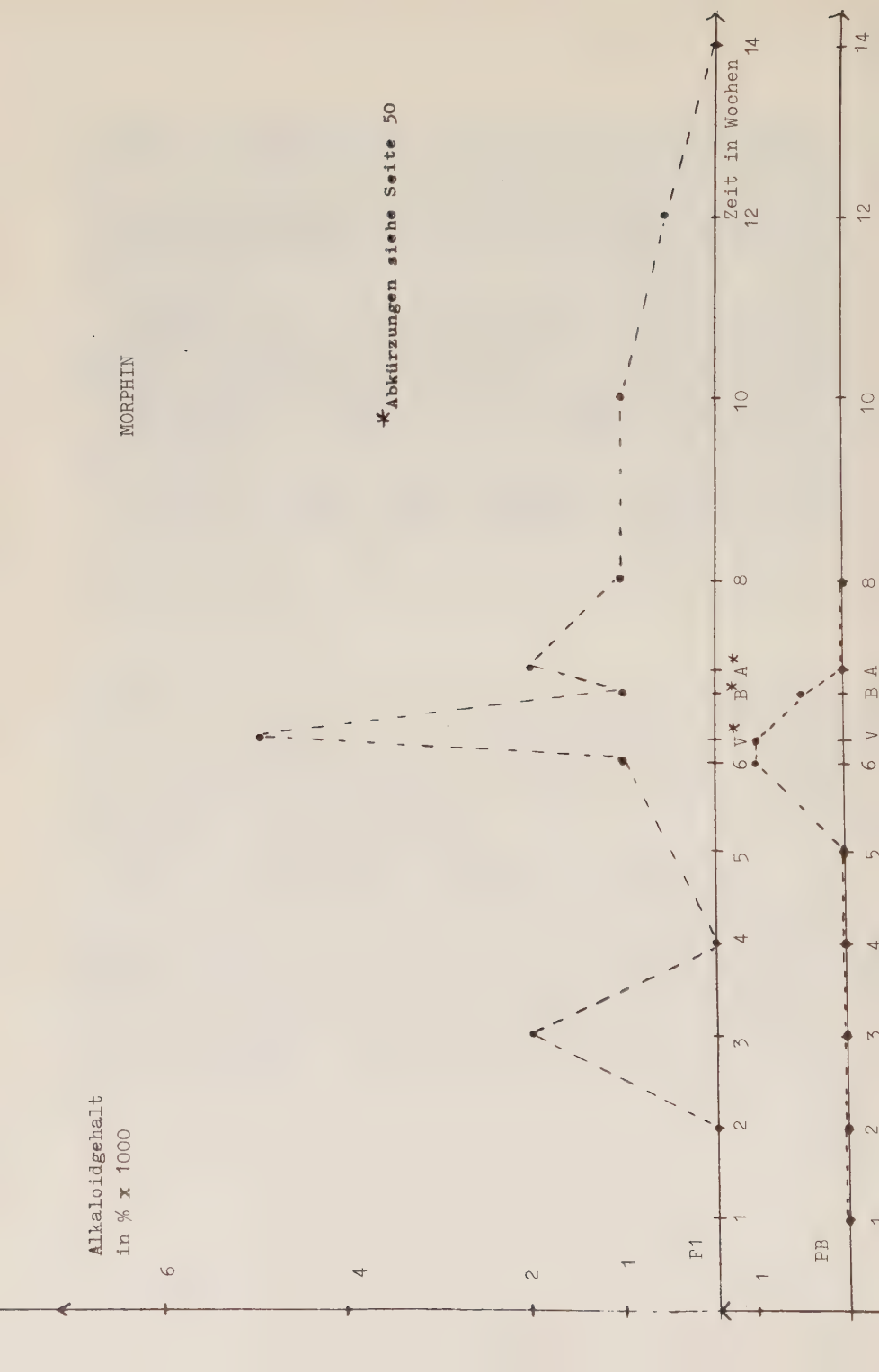
1

1

\*Abkürzungen siehe Seite 50

Zeit in Wochen  
12  
14

12  
14



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN

Zeit in Wochen

8  
6  
4  
2  
1  
F2  
1

14

10

9

8

B A

6 V

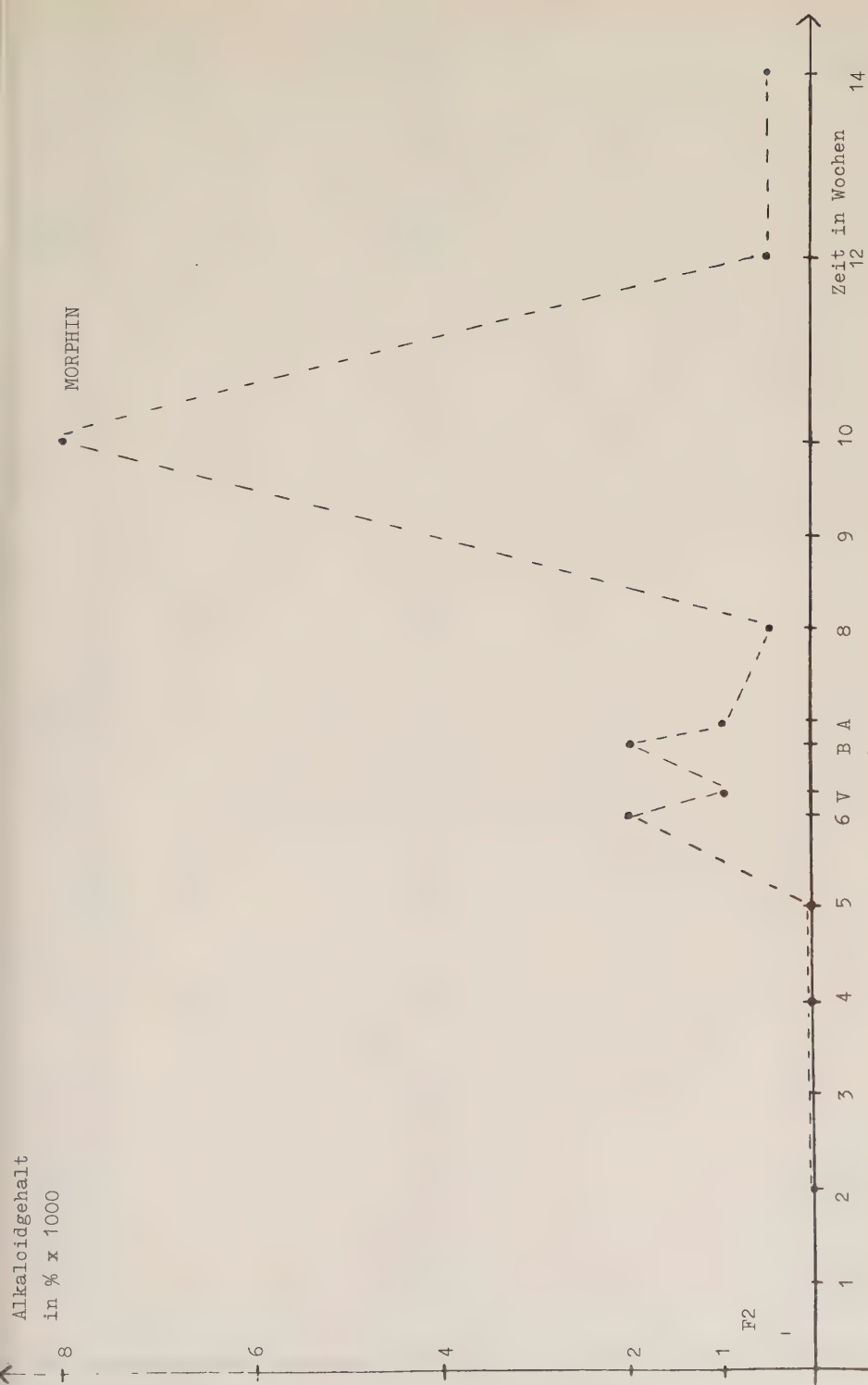
5

4

3

2

1

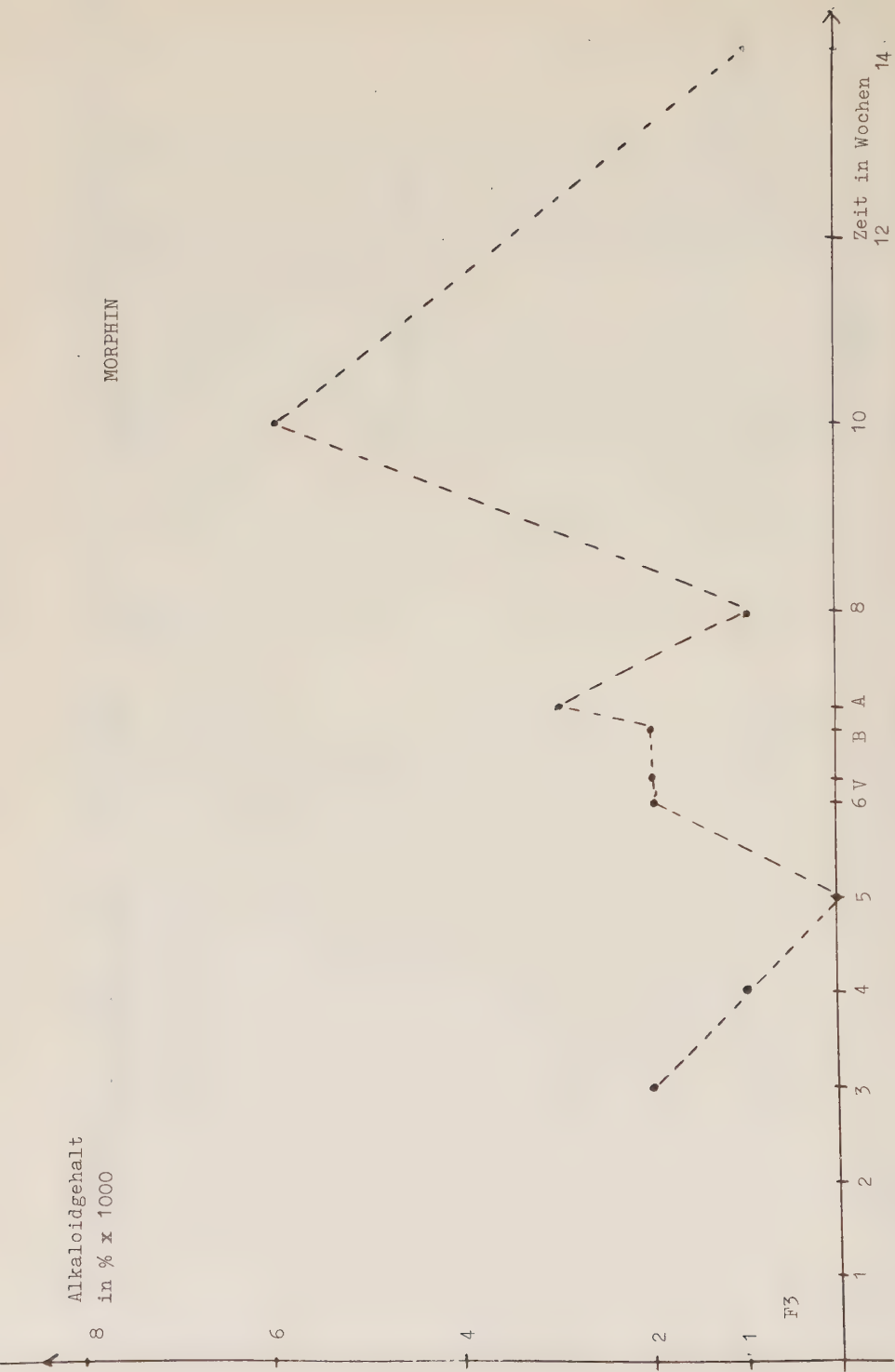


Alkaloidgehalt  
in %  $\times 1000$

MORPHIN

F3

Zeit in Wochen  
12  
14



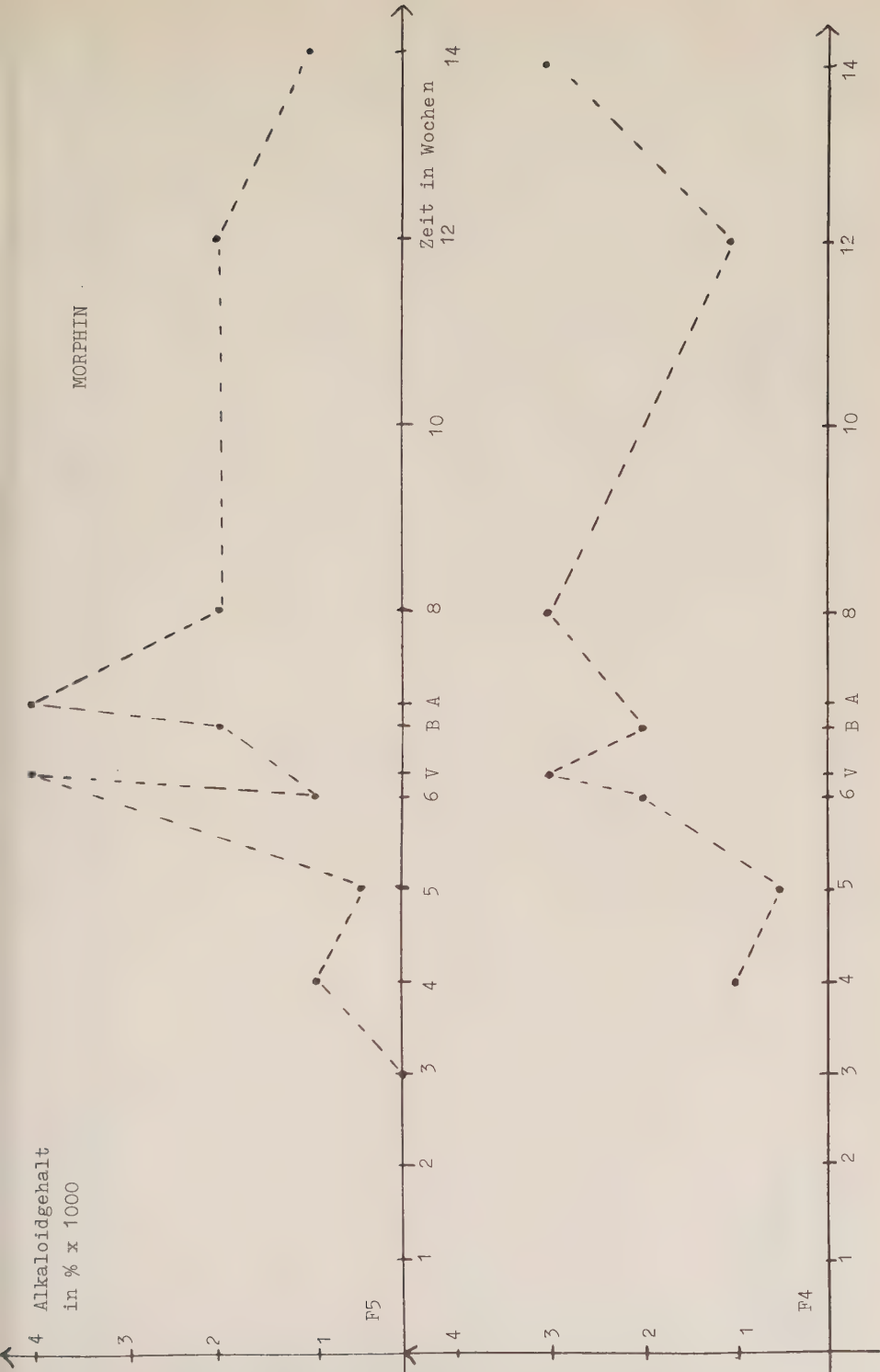
Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN

Zeit in Wochen

F5

F4



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN

6  
5  
4  
3  
2  
1

F6

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

4

3

2

1

6

5

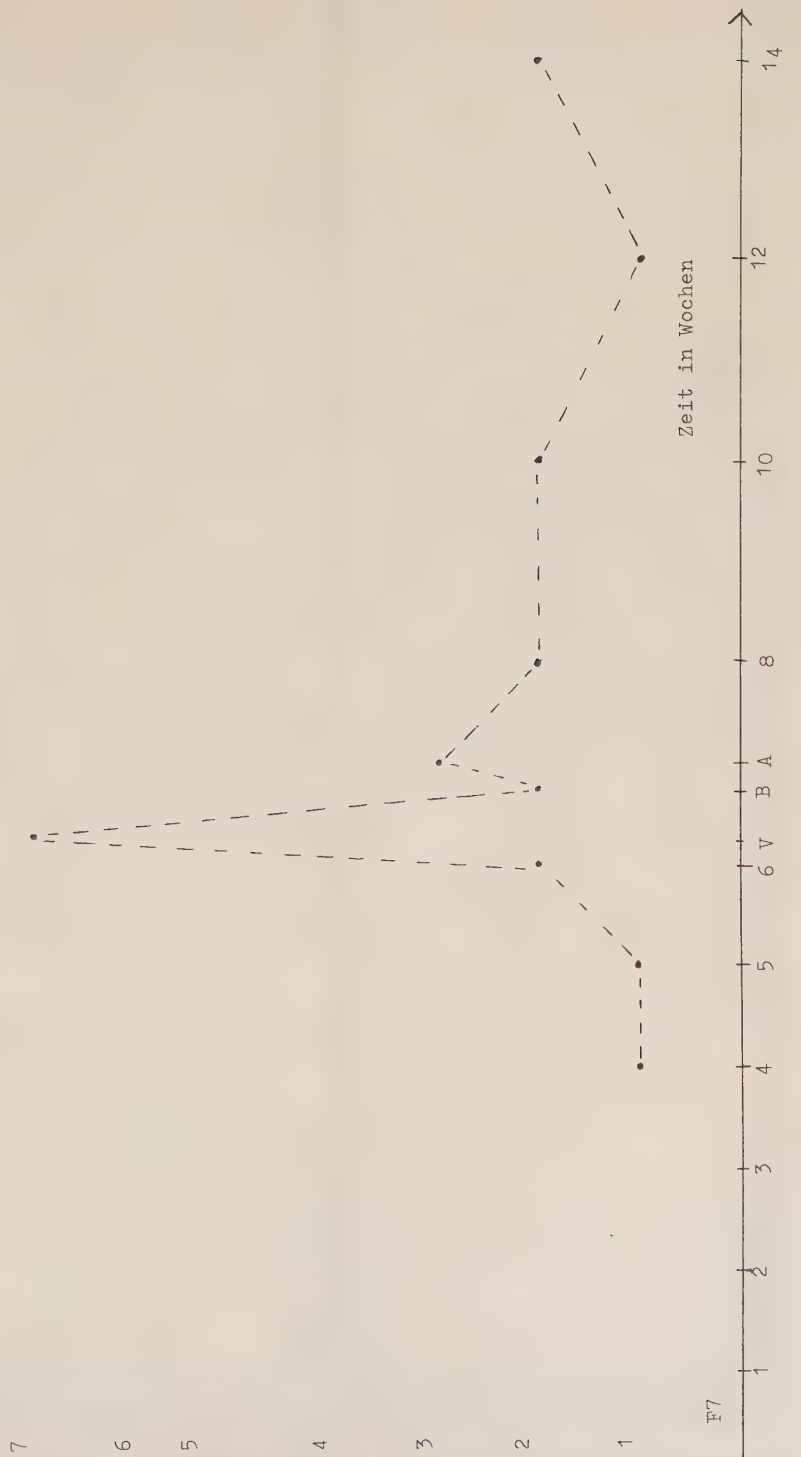
4

3

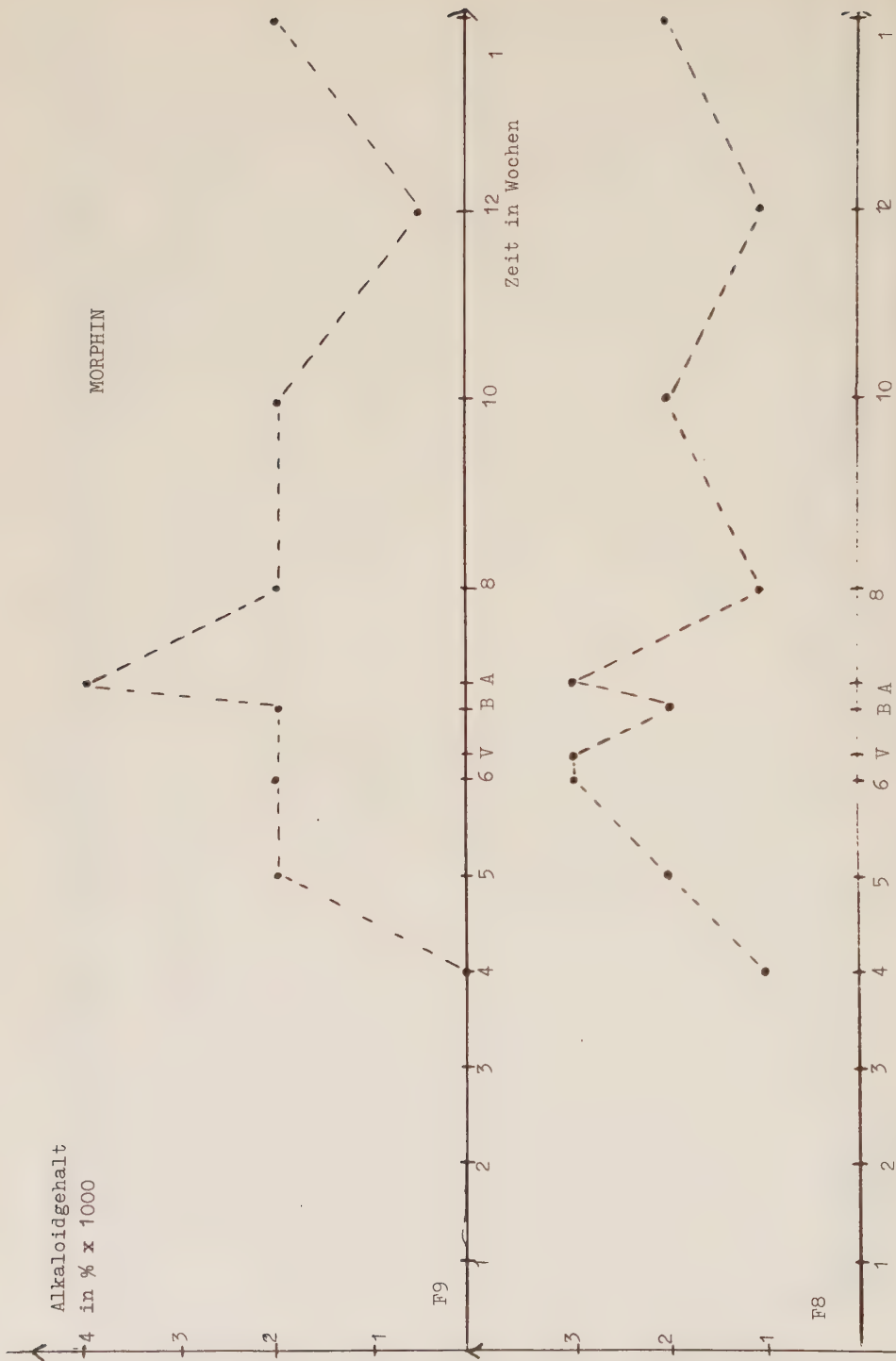
2

Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN



# MORPHIN



Alkaloidgehalt

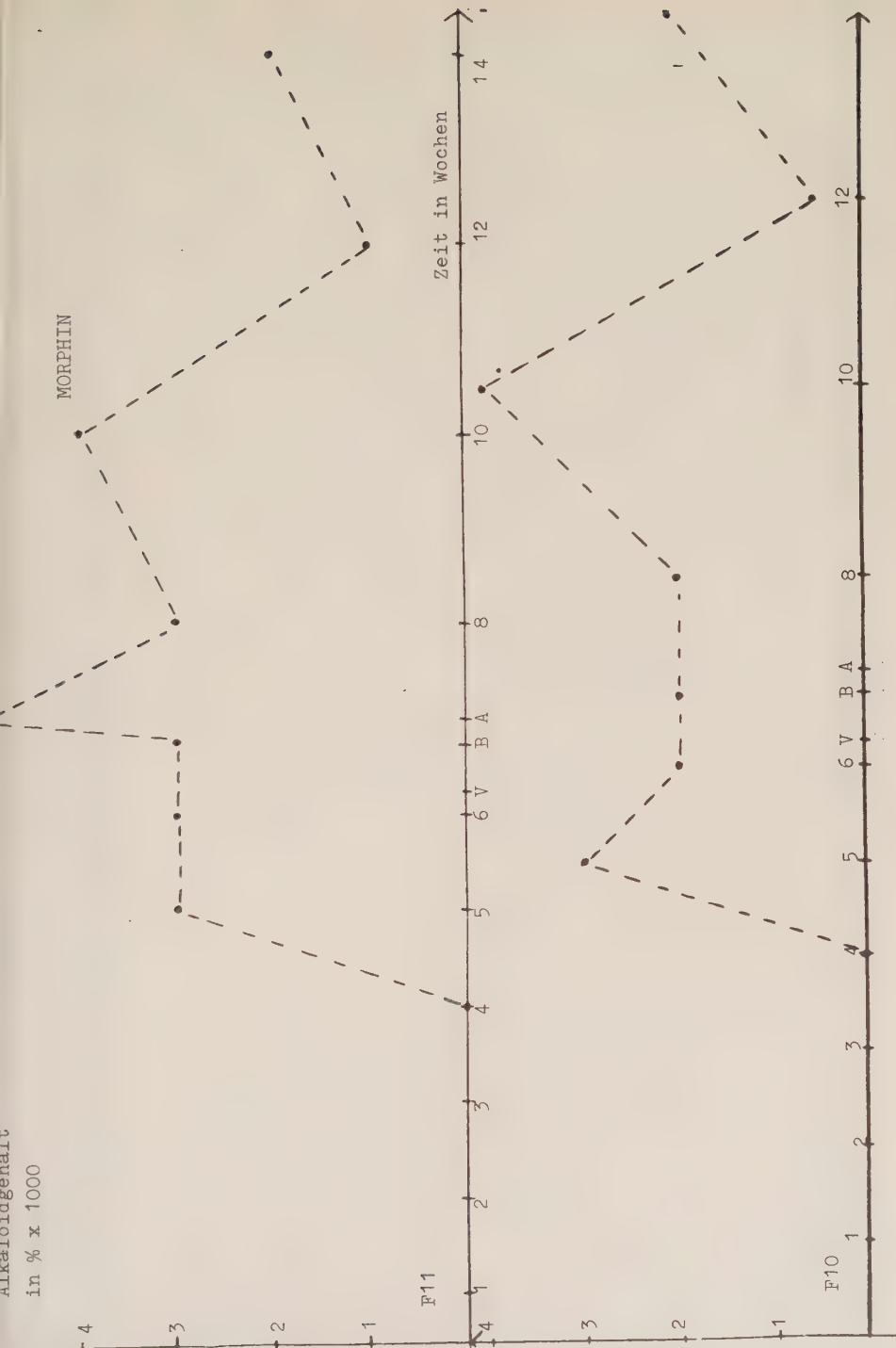
in % x 1000

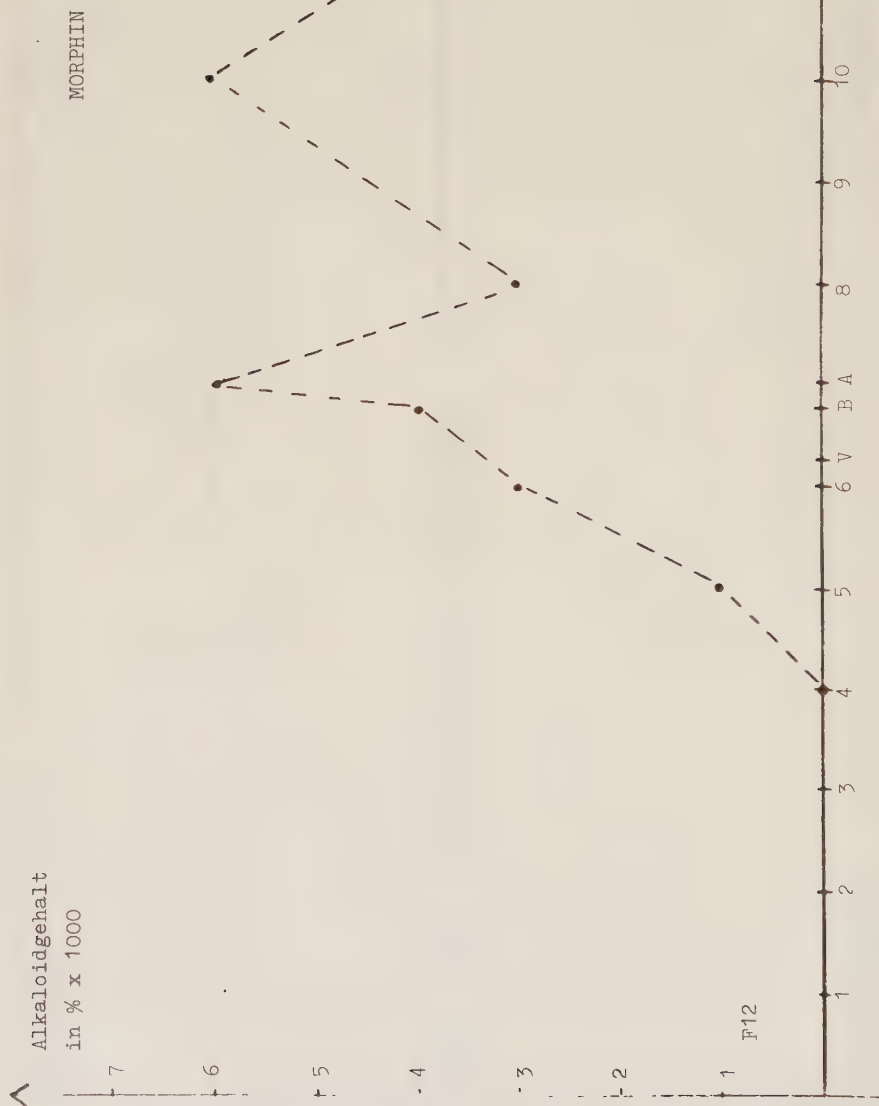
MORPHIN

F11

Zeit in Wochen

F10





Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN

F13

Zeit in Wochen

1

2

3

4

5

6 V

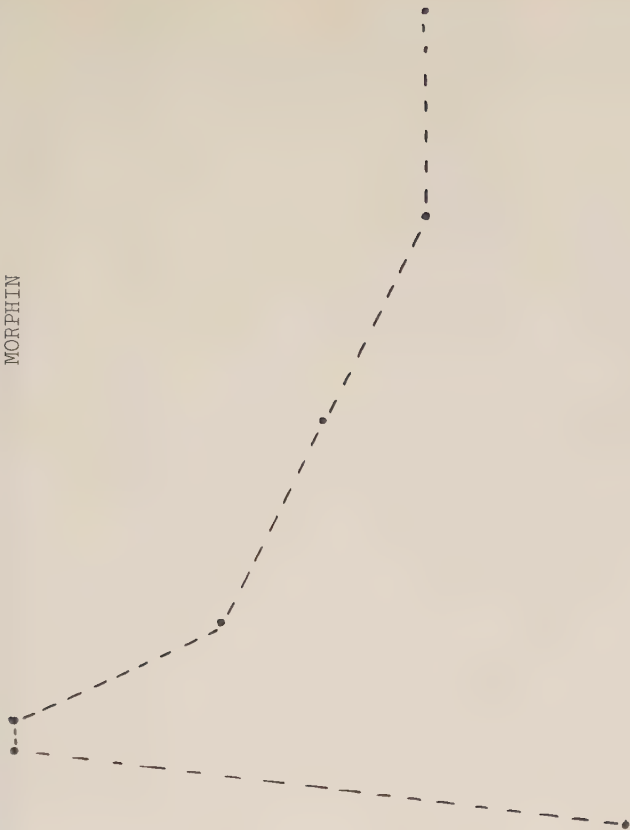
B A

8

10

12

14

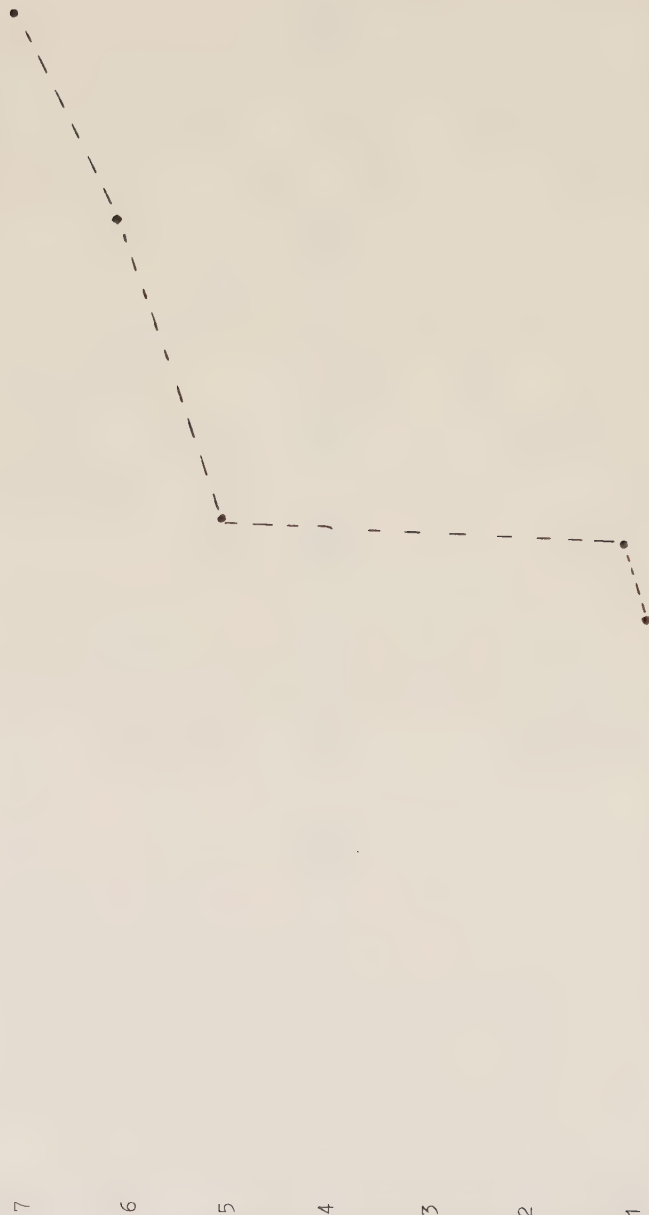


Alkaloidgehalt  
in % x 1000

MORPHIN

Zeit in Wochen

F14



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

CODEIN

F4

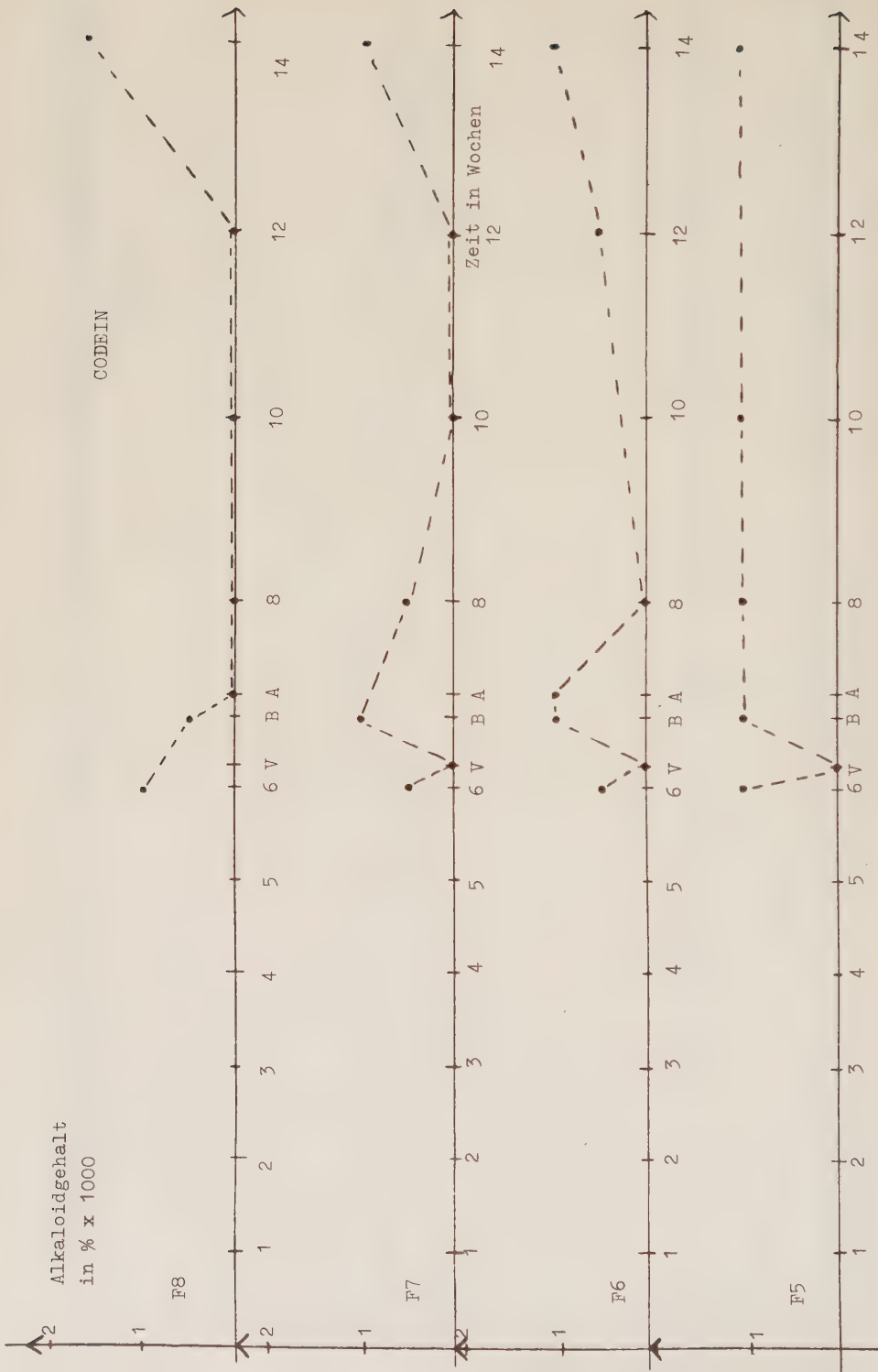


F3



F2





2 Alkaloidgehalt  
in % x 1000

CODEIN

F11

1

2

3

4

5

6 V

B A

8

10

12

14

2

1

F10

1

2

3

4

5

6 V

B A

8

10

12

14

Zeit in Wochen

F9

1

2

3

4

5

6 V

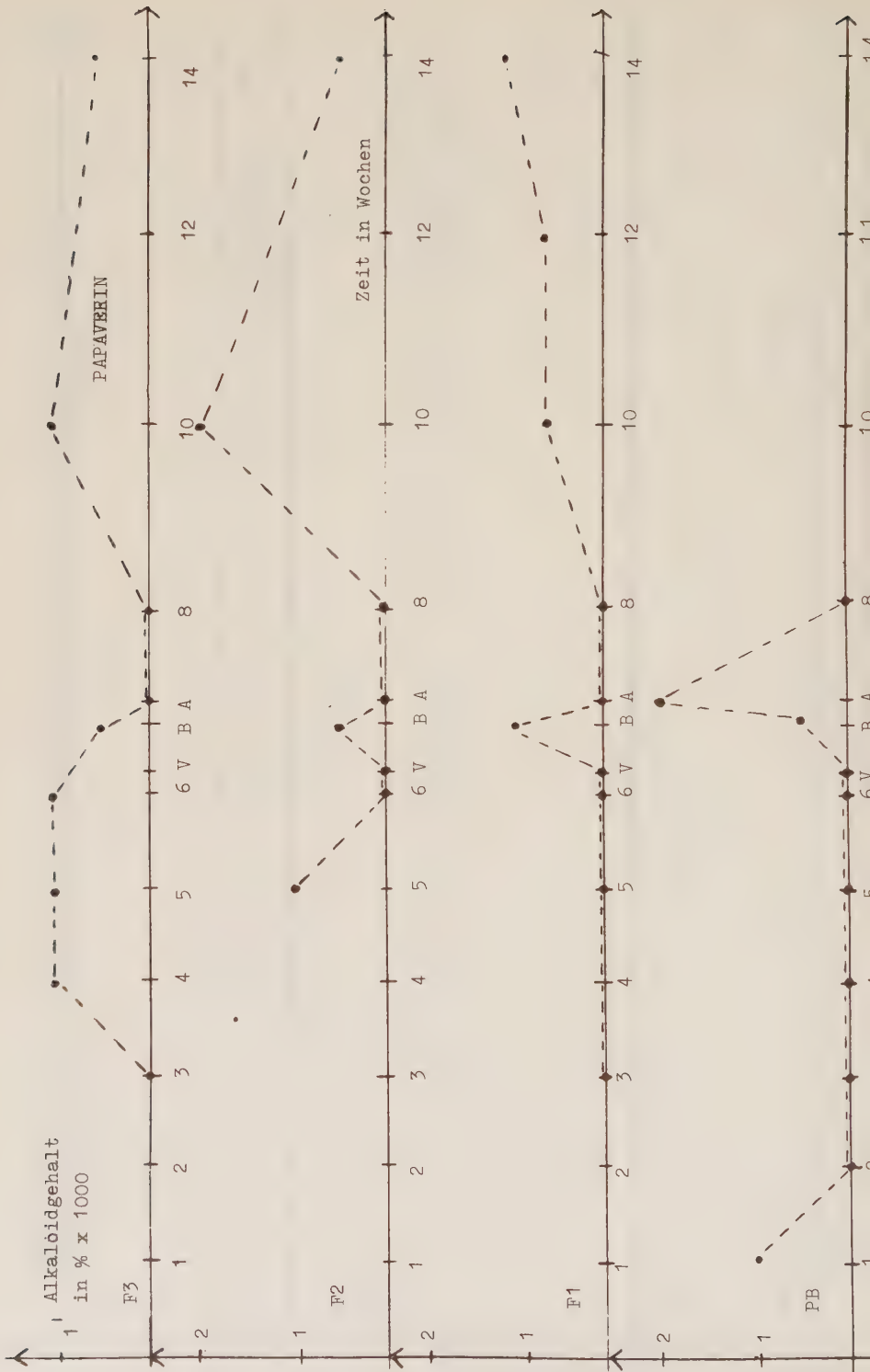
B A

8

10

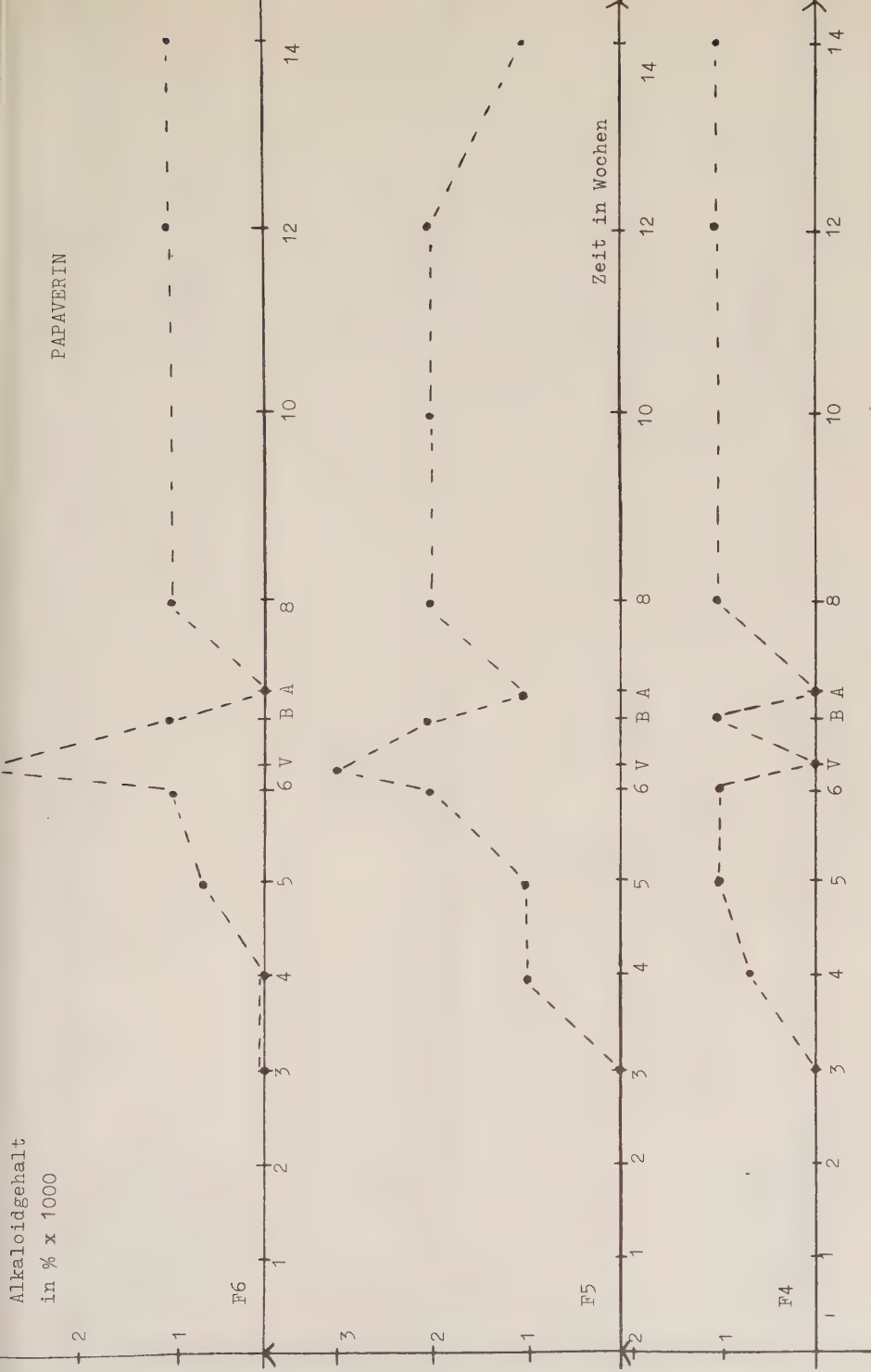
12

14



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

PAPAVERIN



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

PAPAVERIN

F8

1

2

3

4

5

6 V

B A

8

10

12

14

F7

1

2

3

4

5

6 V

B A

8

10

11

14

Zeit in Wochen

Alkaloidgehalt  
in % x 1000

PAPAVERIN

5

4

3

2

1

F9

Zeit in Wochen

12

10

8

A

B

V

6

5

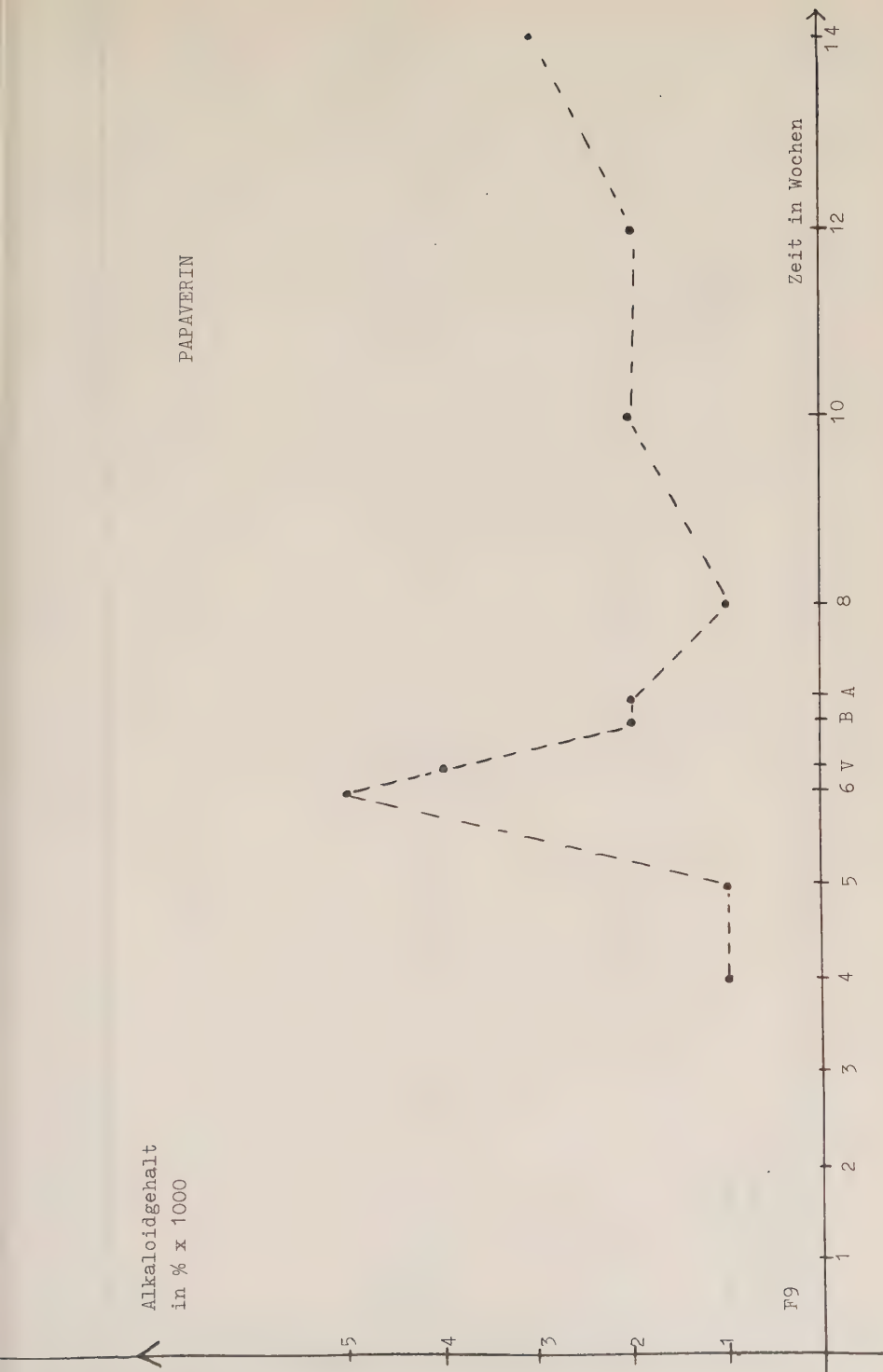
4

3

2

1

14

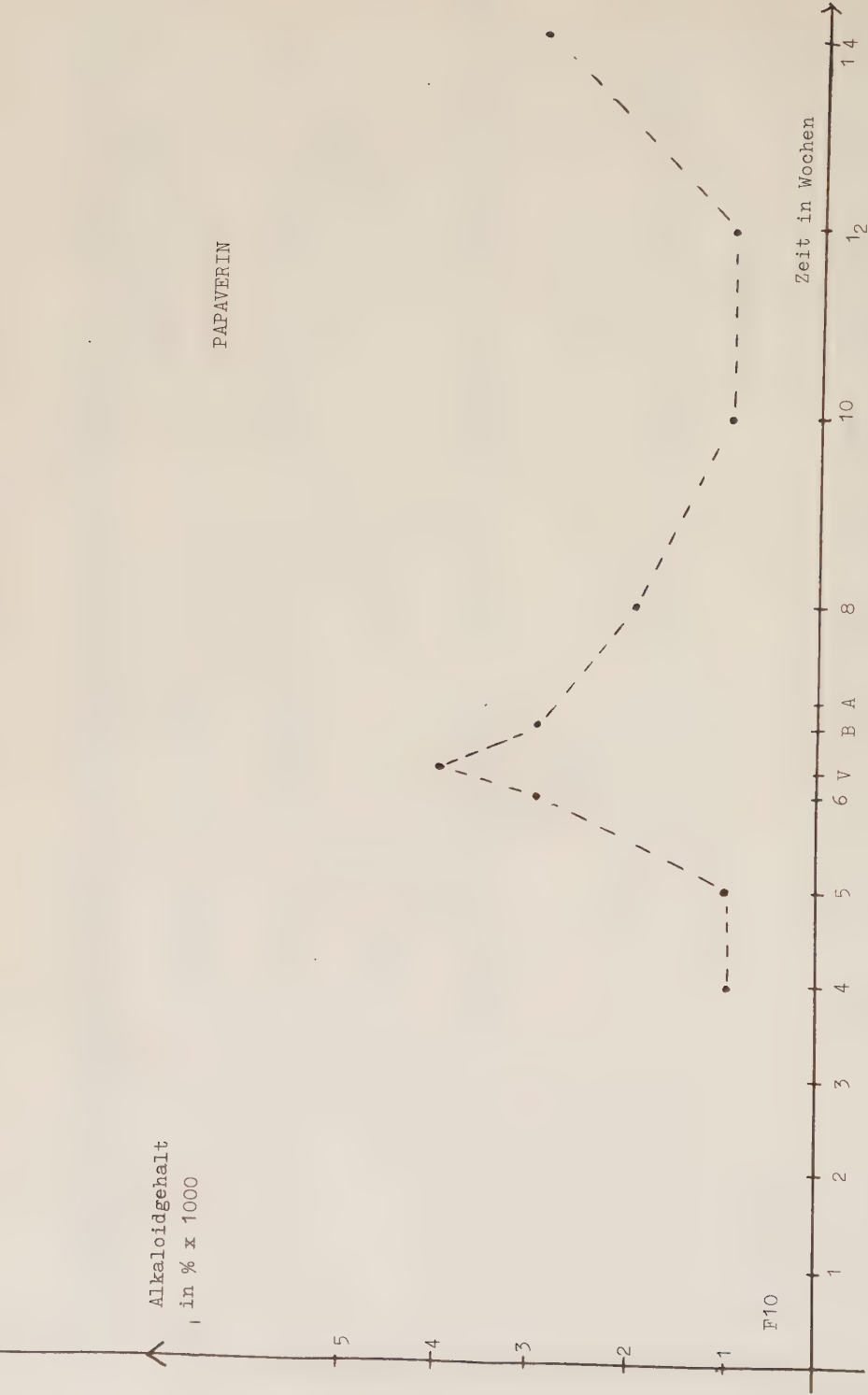


Alkaloidgehalt  
in % x 1000

PAPAVERIN

F10

Zeit in Wochen



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

PAPAVERIN

5

4

3

2

1

F11

Zeit in Wochen

1

2

3

4

5

6

V

A

8

10

12

14

5

4

2

2

1

7

9

11

13

15

17

19

21

23

25

27

29

31

33

35

37

39

41

43

45

47

49

51

53

55

57

59

61

63

65

67

69

71

73

75

77

79

81

83

85

87

89

91

93

95

97

99

101

103

105

107

109

111

113

115

117

119

121

123

125

127

129

131

133

135

137

139

141

143

145

147

149

151

153

155

157

159

161

163

165

167

169

171

173

175

177

179

181

183

185

187

189

191

193

195

197

199

201

203

205

207

209

211

213

215

217

219

221

223

225

227

229

231

233

235

237

239

241

243

245

247

249

251

253

255

257

259

261

263

265

267

269

271

273

275

277

279

281

283

285

287

289

291

293

295

297

299

301

303

305

307

309

311

313

315

317

319

321

323

325

327

329

331

333

335

337

339

341

343

345

347

349

351

353

355

357

359

361

363

365

367

369

371

373

375

377

379

381

383

385

387

389

391

393

395

397

399

401

403

405

407

409

411

413

415

417

419

421

423

425

427

429

431

433

435

437

439

441

443

445

447

449

451

453

455

457

459

461

463

465

467

469

471

473

475

477

479

481

483

485

487

489

491

493

495

497

499

501

503

505

507

509

511

513

515

517

519

521

523

525

527

529

531

533

535

537

539

541

543

545

547

549

551

553

555

557

559

561

563

565

567

569

571

573

575

577

579

581

583

585

587

589

591

593

595

597

599

601

603

605

607

609

611

613

615

617

619

621

623

625

627

629

631

633

635

637

639

641

643

645

647

649

651

653

655

657

659

661

663

665

667

669

671

673

675

677

679

681

683

685

687

689

691

693

695

697

699

701

703

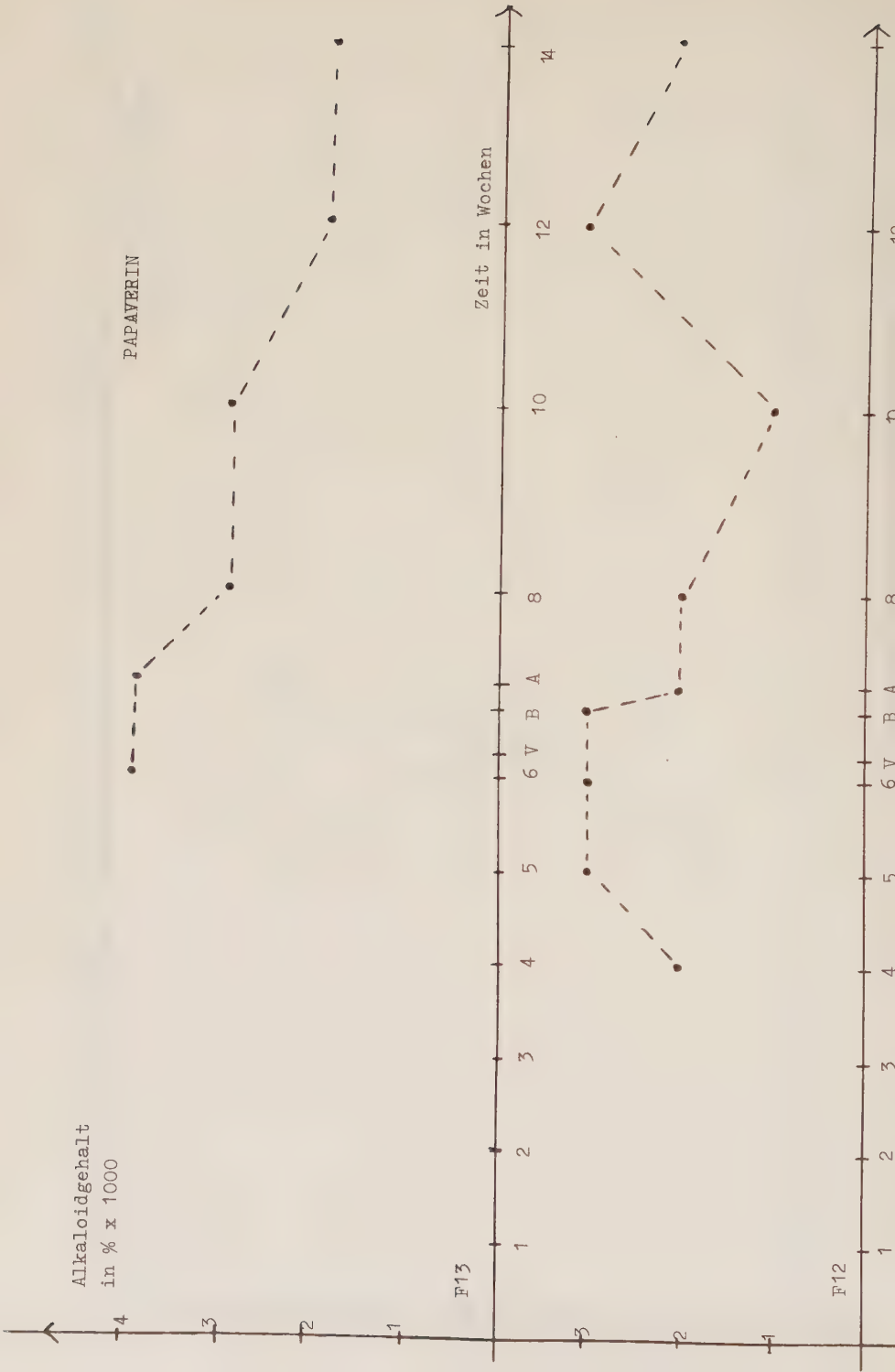
Alkaloidgehalt  
in % x 1000

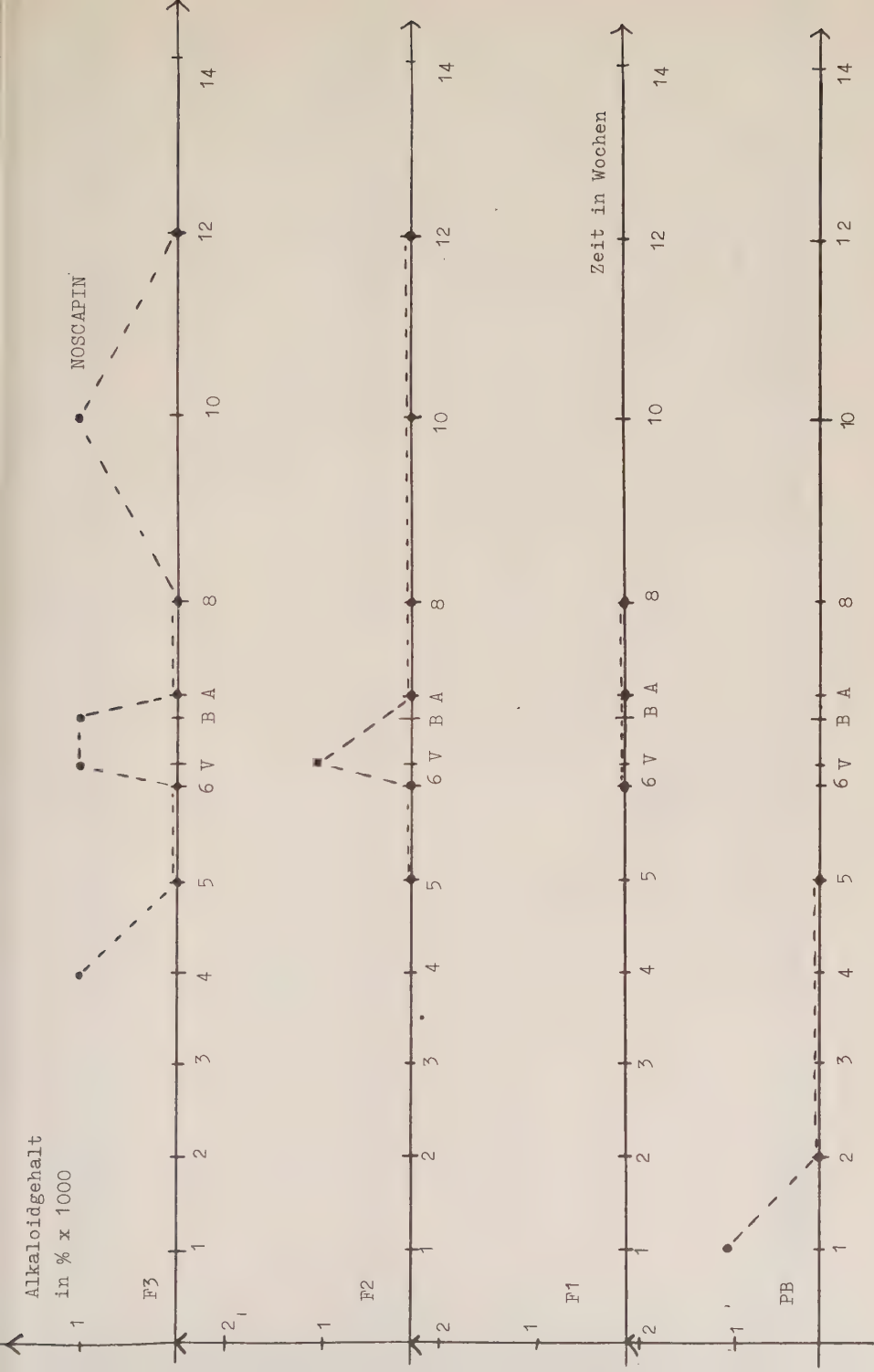
PAPAVERIN

Zeit in Wochen

F13

F12





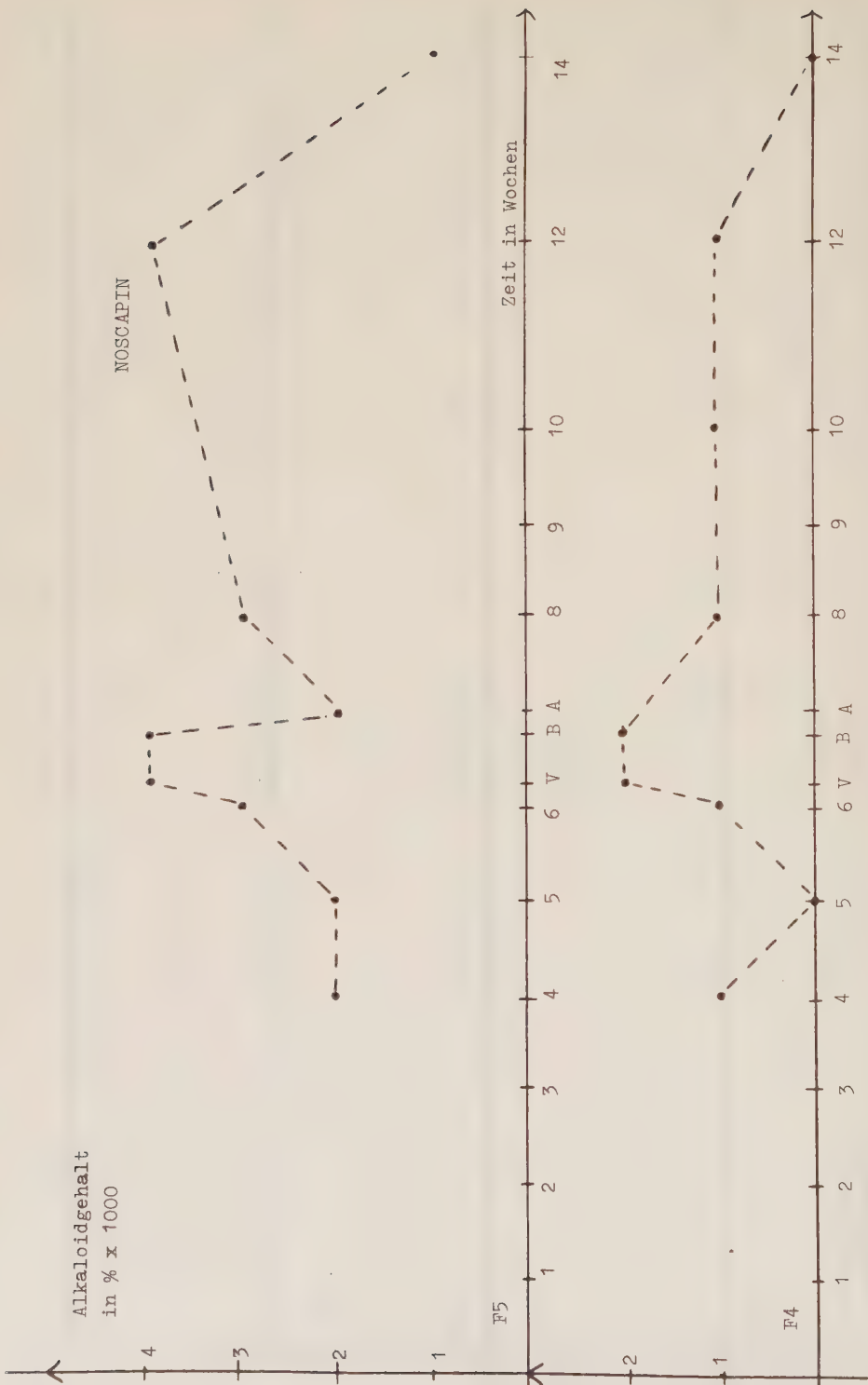
Alkaloidgehalt  
in % x 1000

NOSCAPIN

Zeit in Wochen

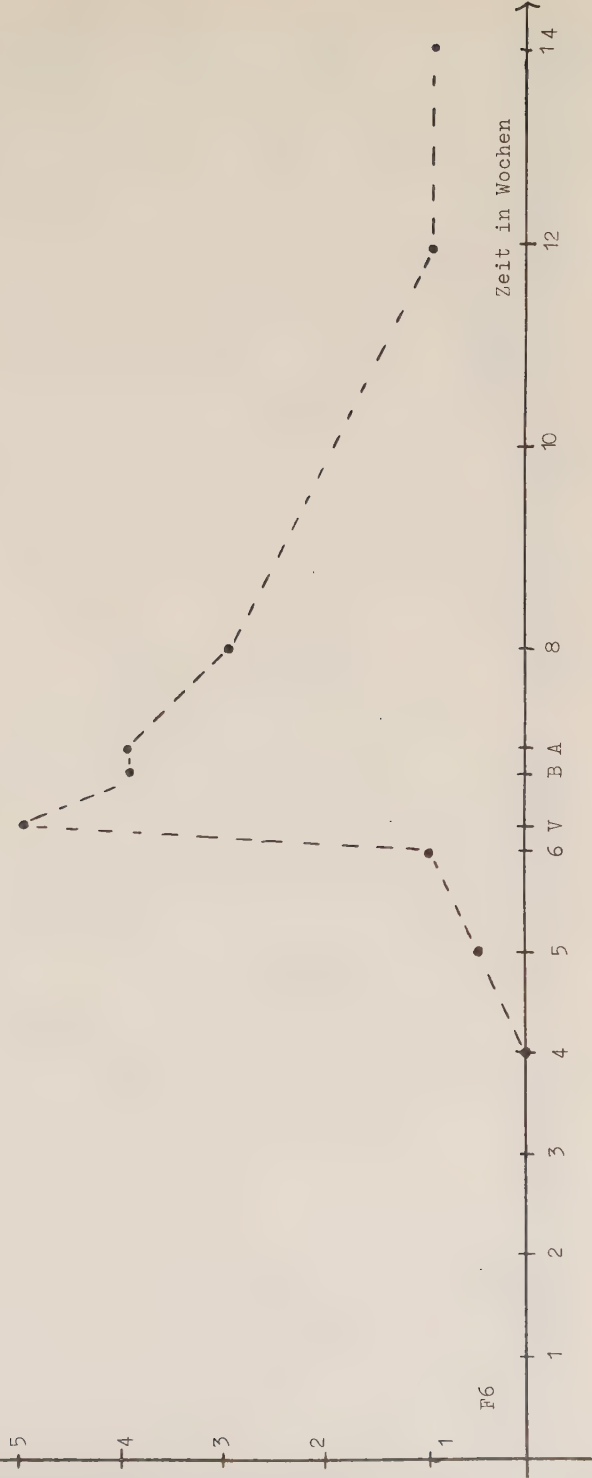
F5

F4



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

NOSCAPIN



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

NOSCAPIN

6

5

4

3

2

1

F7

Zeit in Wochen

1

2

3

4

5

6

V

B

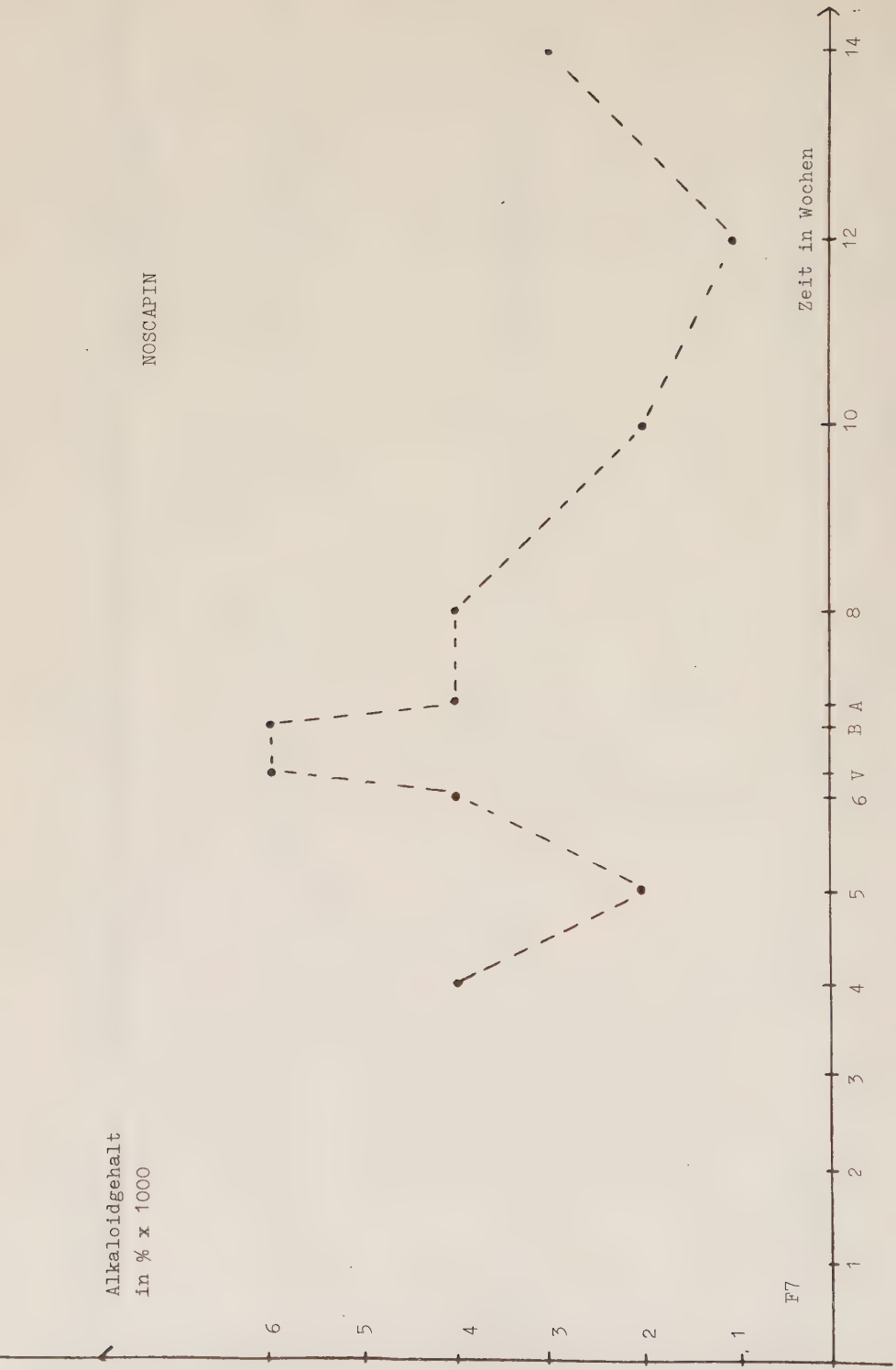
A

8

10

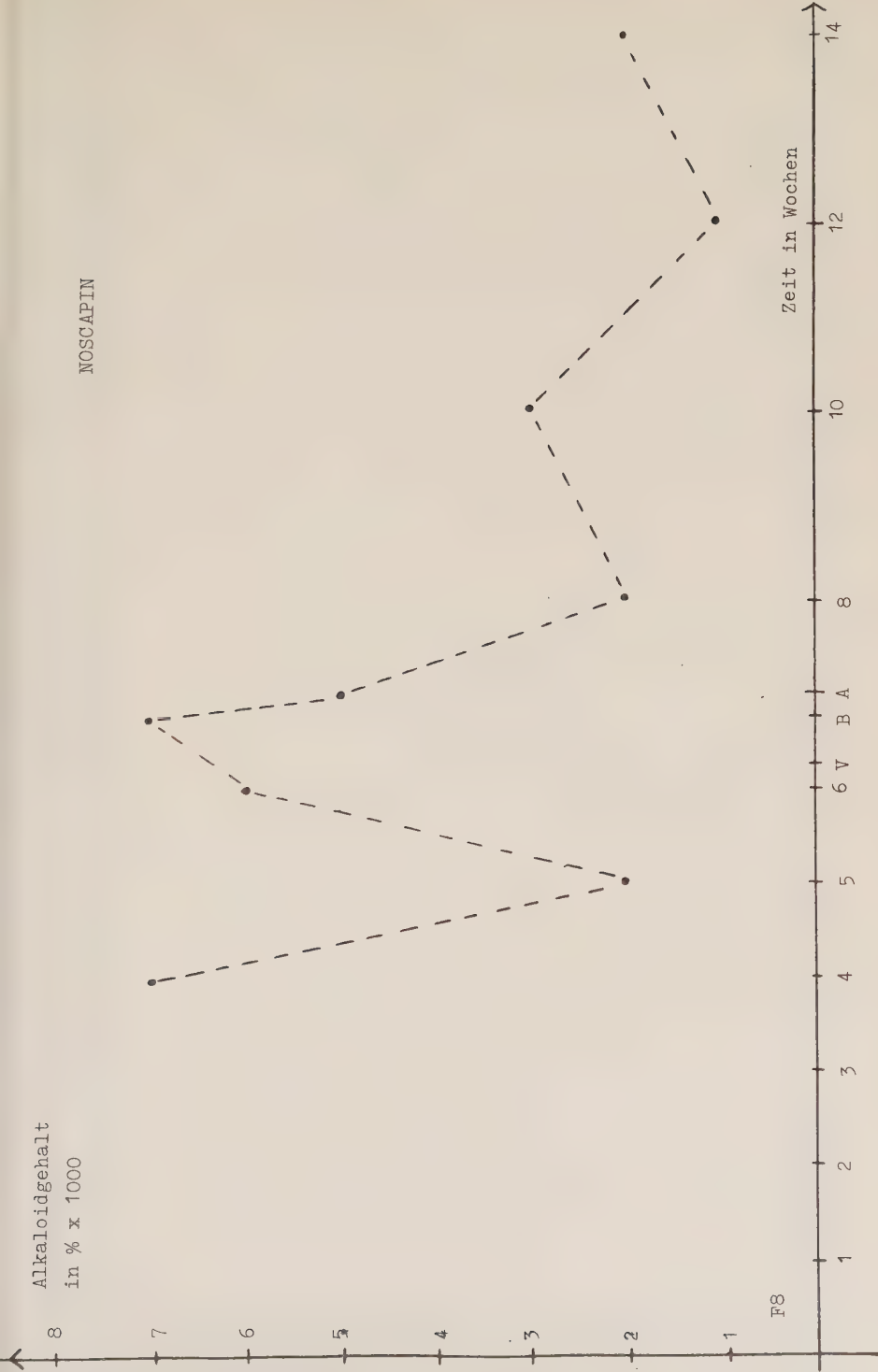
12

14



Alkaloidgehalt  
in % x 1000

NOSCAPIN



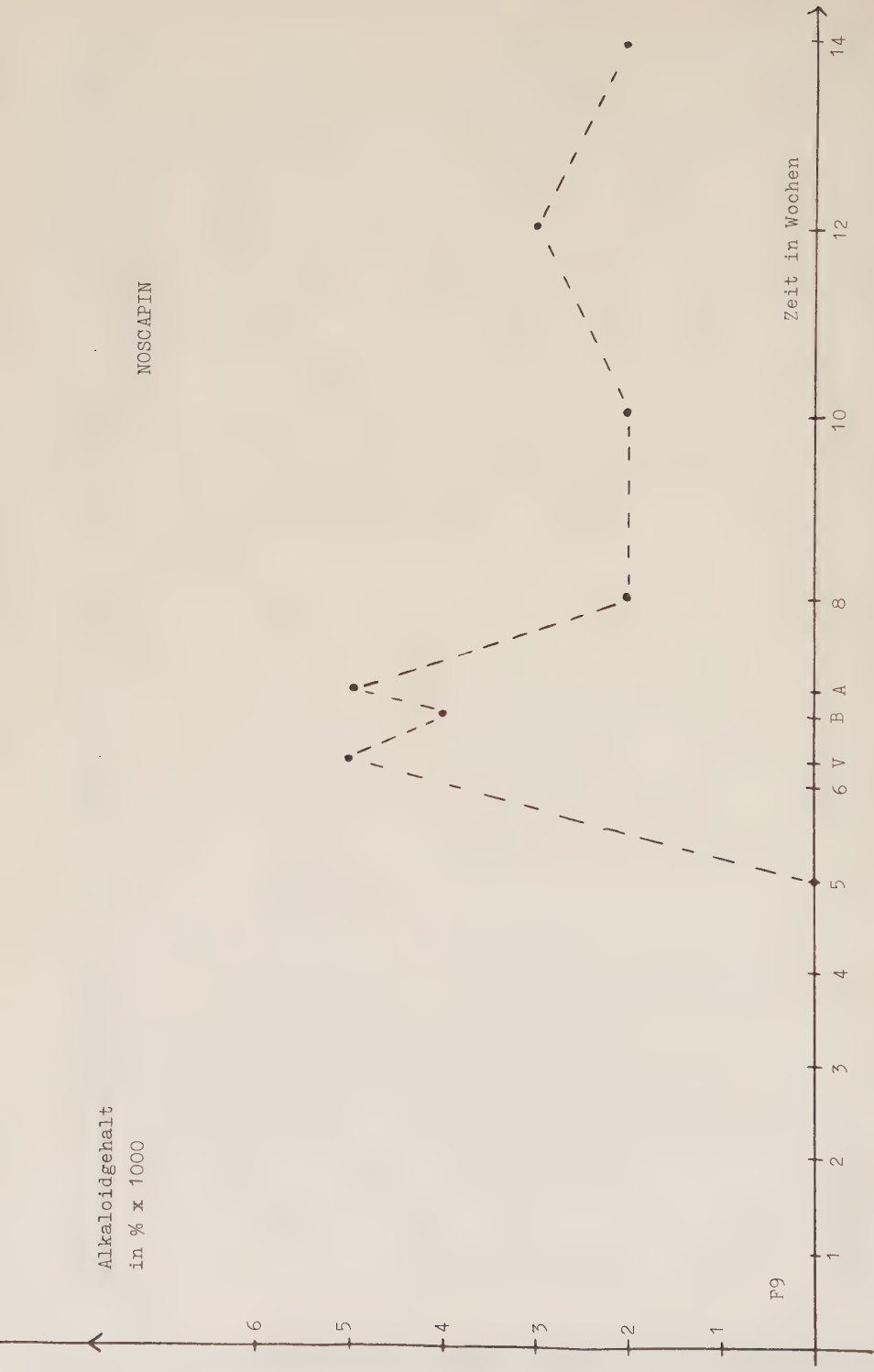
F8

Alkaloidgehalt  
in % x 1000

NOSCAPIN

F9

Zeit in Wochen

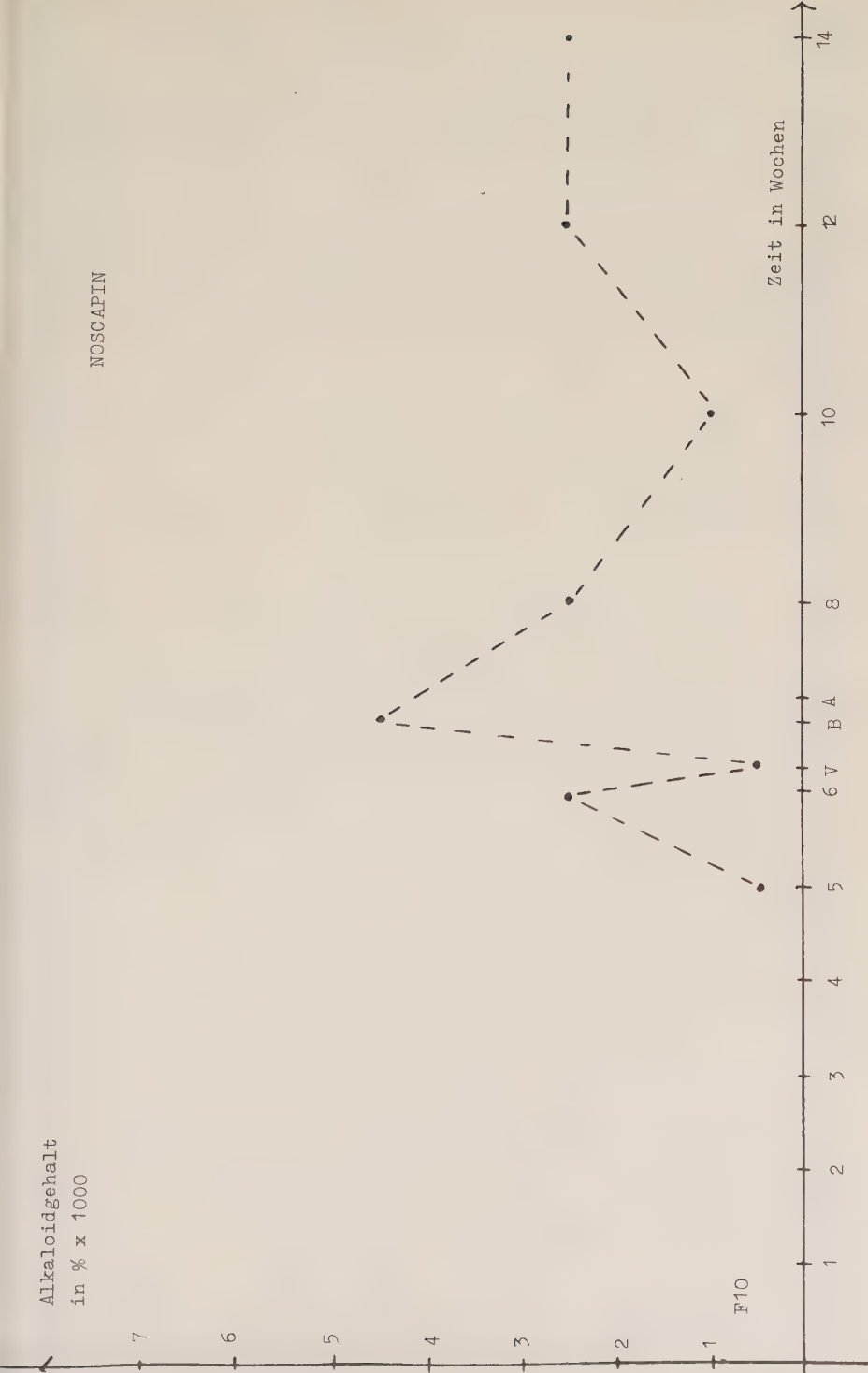


Alkaloidgehalt  
in % x 1000

NOSCAPIN

F10

Zeit in Wochen

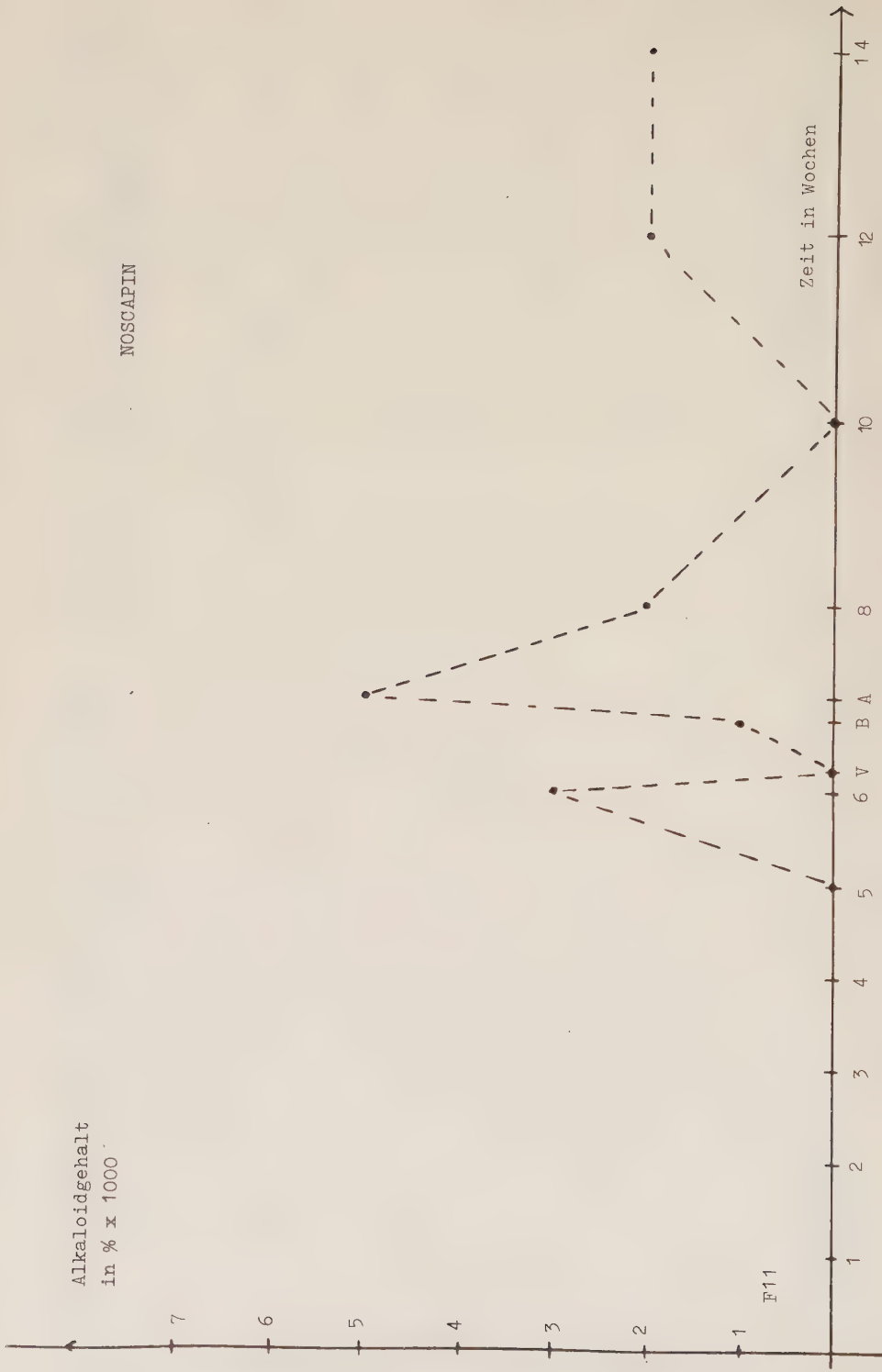


Alkaloidgehalt  
in % x 1000

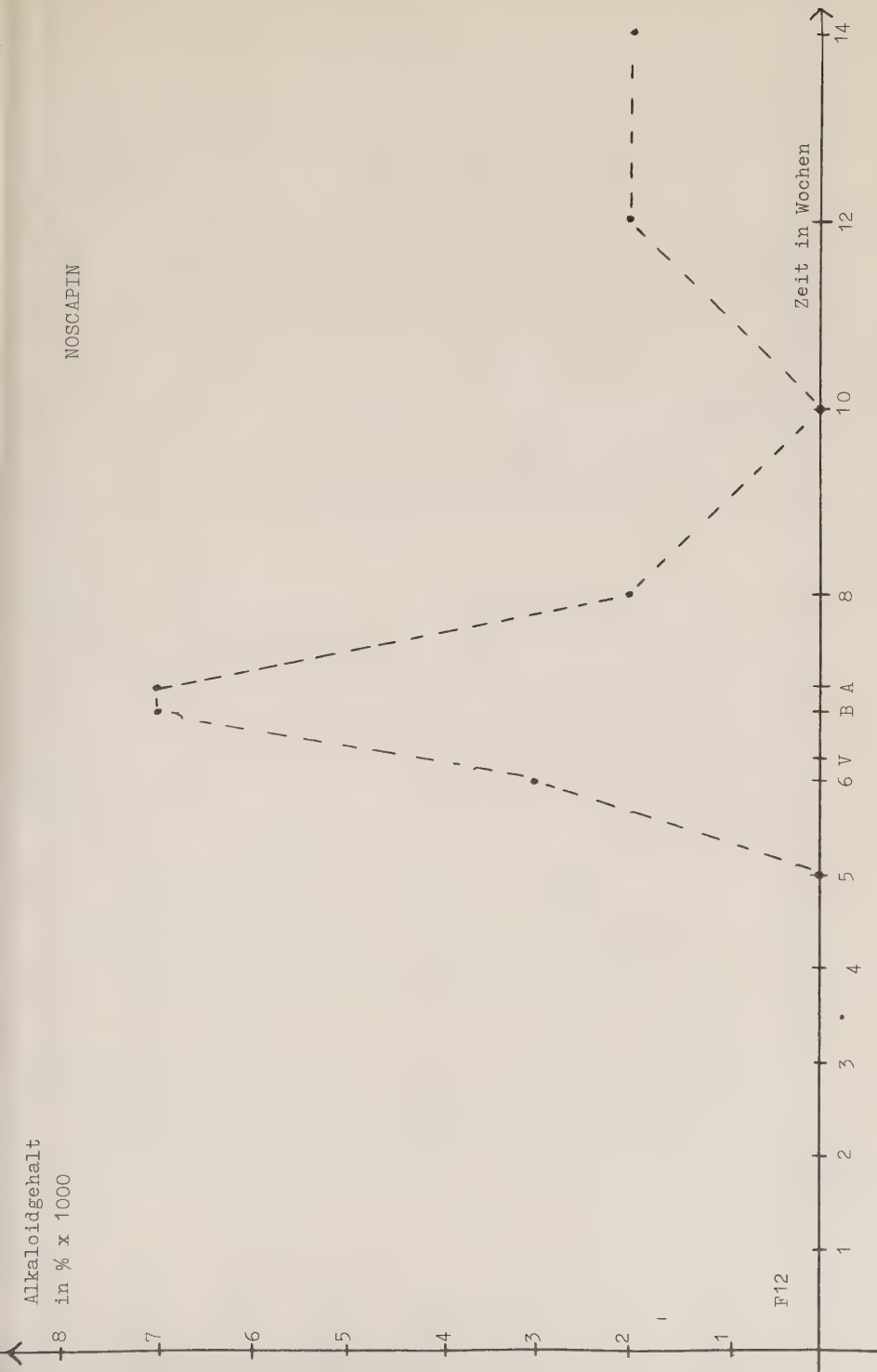
NOSCAPIN

F11

Zeit in Wochen

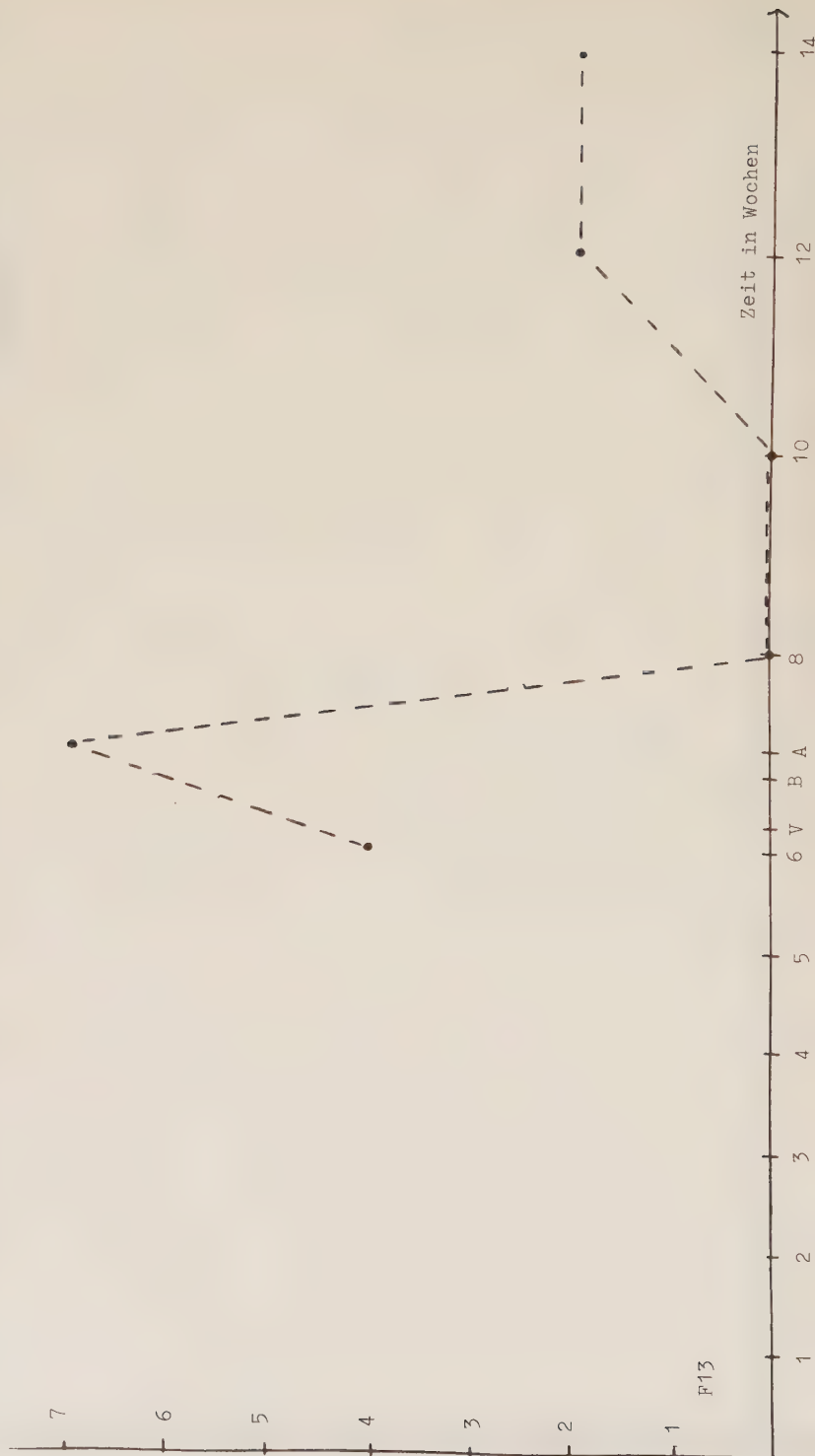


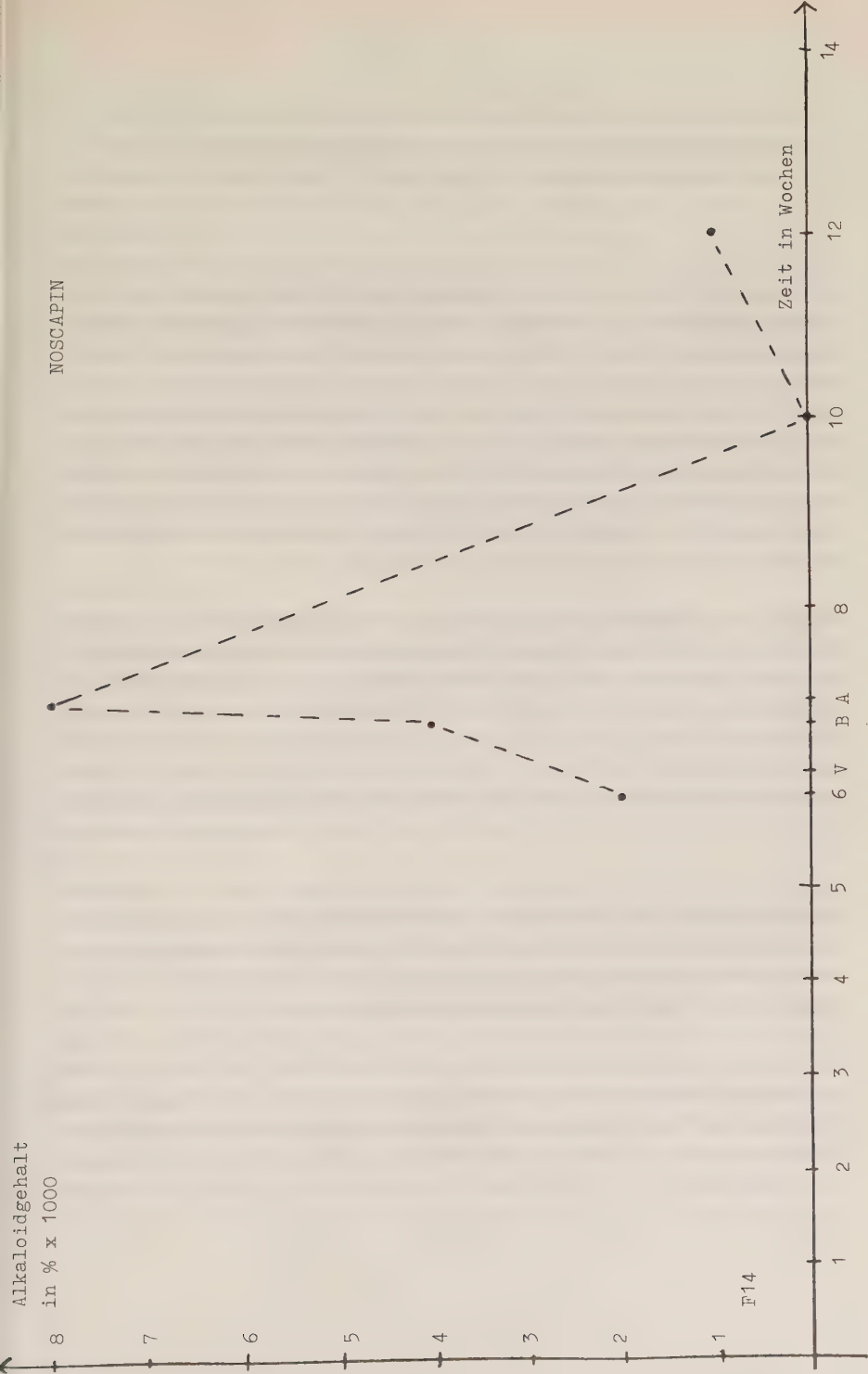
# NOSCAPIN



Alkaloidgehalt  
- 8 in % x 1000

NOSCAPIN





#### 4. Ergänzende Untersuchungen über den Alkaloidgehalt von Keimpflanzen, Samen und Latex, aufgezeigt an den Hauptalkaloiden

##### Keimpflanzen:

Um Aufschluß über die Verteilung der Hauptalkaloide Morphin, Codein, Papaverin und Noscapin in allen Entwicklungsstadien der Vegetationsperiode zu haben, werden Keimpflanzen gesondert untersucht.

Dazu läßt man Samen auf feuchtem Filtrierpapier, bei Tageslicht und Raumtemperatur keimen. Nach 24 Stunden zeigt ein Teil der Samen Würzelchen und nach 48 Stunden erscheinen die ersten, noch chlorophyllarmen Keimblättchen. Nach drei Tagen ist die vollständige Keimpflanze ausgebildet. (Unter den angegebenen Bedingungen lassen sich die Pflanzen maximal 10 Tage am Leben erhalten).

Von den vier Hauptalkaloiden läßt sich in ein bis drei Tage alten Pflanzen nur Noscapin dünn-schichtchromatographisch nachweisen. Bei vier Tage alten Pflanzen treten Morphin, Papaverin und Noscapin auf.

Im Alter von fünf bis sechs Tagen sind nachzuweisen: Papaverin und Noscapin.

Bei sieben Tage alten Pflanzen treten Morphin, Papaverin und Noscapin auf, bis zum zehnten Tag dann nur noch Papaverin und Noscapin.

In den einzelnen Pflanzenteilen der Keimpflanzen sind zu finden:

in den Wurzeln drei Tage alter Keimpflanzen: Noscapin, ebenso in den Keimblättchen, den Stengeln und den anhaftenden Samenschalen;

in den Stengeln 10 Tage alter Keimpflanzen: Noscapin;

Codein könnte jedoch niemals nachgewiesen werden.

Bei dieser Untersuchung wurde besonders deutlich, daß Morphin kein Stoffwechselendprodukt sein kann, sondern gerade in der ganz jungen Pflanze einer sehr raschen Metabolisierung -bis zum vollständigen Abbau- unterliegt, wie aus der Tatsache zu ersehen ist, daß Morphin

bei vier Tage alten Keimpflanzen erstmals auftritt, dann bis zum siebten Tag nicht mehr nachweisbar ist, kurzfristig auftritt und danach wieder unter die Nachweisgrenze absinkt.

Codein konnte in den Keimpflanzen nicht nachgewiesen werden, da es offenbar zu rasch zu Morphin abgebaut wird.

Papaverin ist vom ersten Auftreten an, solange die Pflanzen am Leben erhalten werden können, anwesend.

Noscapin scheint das vorherrschende Alkaloid in der ganz jungen Pflanze zu sein. Es ist dasjenige Hauptalkaloid das im gesamten Entwicklungszyklus der Pflanze am stetigsten auftritt. Mit Ausnahme der etwa vierwöchigen Phase von der Bildung der ersten Folgeblätter an bis zum Schossen, in der Noscapin in den Laubblättern nicht nachzuweisen ist, kommt es in allen Entwicklungsstadien der Pflanze vor, angefangen vom Samen über Keimpflanzen, vollausgebildete Pflanzen bis zur welkenden Pflanze.

#### Samen:

Da auch in den anhaftenden Samenschalen Alkaloide zu finden waren, wurden intakte Samen ebenfalls untersucht.

Dünnschichtchromatographisch konnte nachgewiesen werden, daß der Samen von Papaver somniferum unter anderem die Hauptalkaloide Morphin, Papaverin und Noscapin in geringen Spuren (unter 0,0001 %) enthielt. Bei untersuchten Mengen von 10 g Samen waren die Hauptalkaloide nur unter UV-Licht nicht aber mit DRAGENDORFF-Reagenz nachzuweisen.

#### Latex:

Im Milchsaft der Schlafmohnpflanze, aus dem ja auch Opium gewonnen wird, kommen die Alkaloide in besonders hoher Konzentration vor; deshalb wurde der Versuch unternommen, Latex direkt dünnschichtchromatographisch zu analysieren, um auf diese Weise einen schnellen und genauen Einblick in die Alkaloidsituation der Pflanze zu haben.

Zur Latextentnahme ritzte ich die Pflanze mit einer Rasierklinge an und nahm den austretenden Milchsaft mit einer Auftragpipette auf. Der Milchsaft wurde in kleiner Menge (1-3 µl) direkt auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und ohne weitere Behandlung mit dem Fließmittel nach RACZ (20) chromatographiert (siehe experimenteller Teil).

Zu den Chromatogrammen A, B und C:

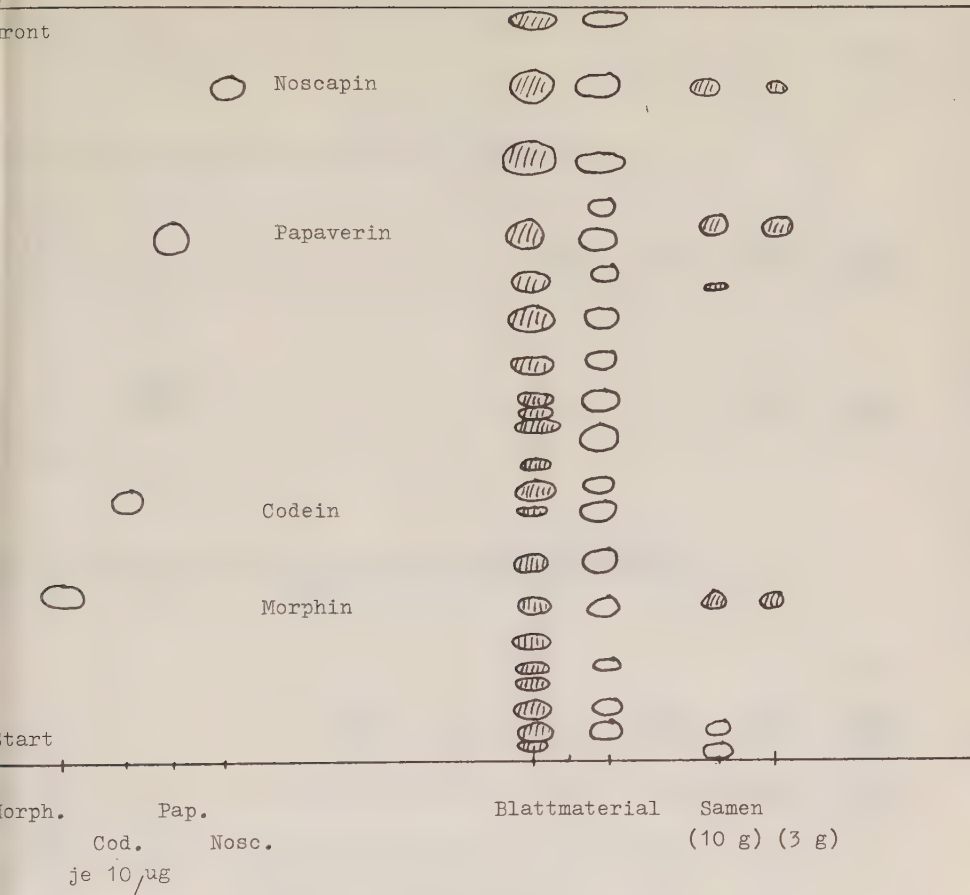
An zwei Beispielen von Chromatogrammen (B und C) wird die Alkaloidsituation von Pflanzen kurz vor dem Aufblühen an Hand von Latexanalysen erläutert.

In Chromatogramm A sind für Blattmaterial von *Papaver somniferum* alle im Chromatogramm erscheinenden Substanzflecken abgebildet; der Übersicht halber sind in den anderen Chromatogrammen nur noch die Flecke der Hauptalkaloide durchgezeichnet.

Chromatogramm B zeigt die Verhältnisse nach Latextentnahme an einer Pflanze: die Schnitte wurden in sehr schneller Folge von unten nach oben verlaufend angelegt, trotzdem trat eine sichtbare Abnahme des Latexflusses auf.

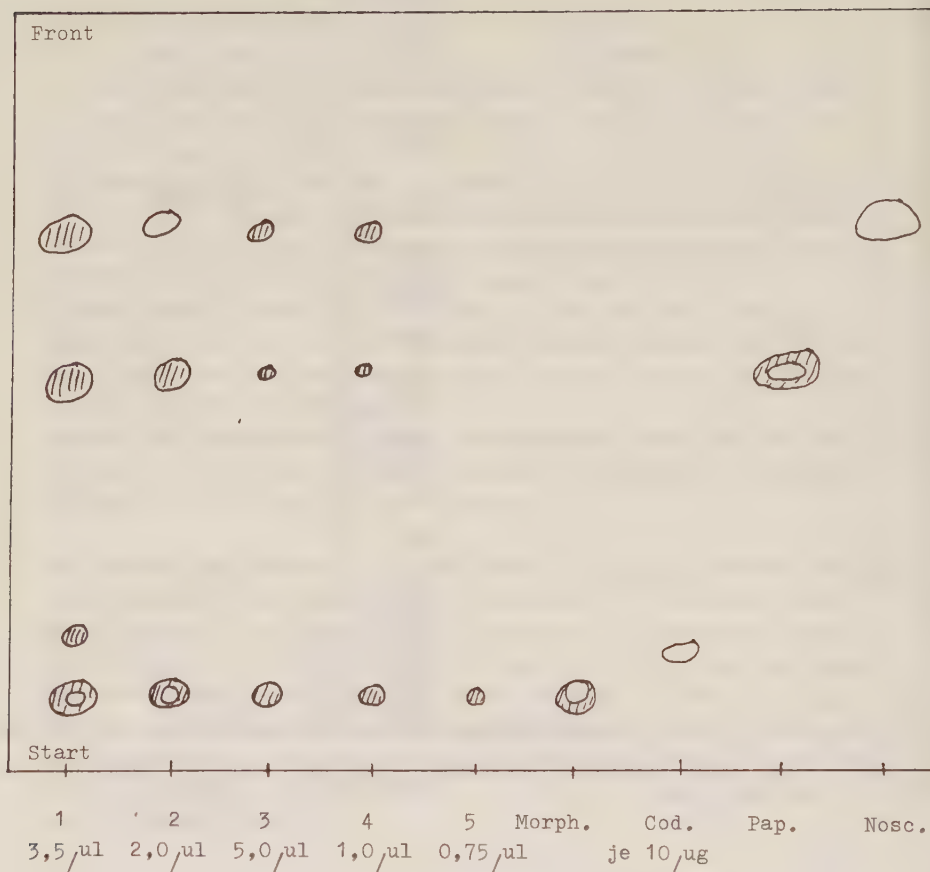
Werden für jeden Schnitt bzw. jede Entnahmefläche neue Pflanzen verwandt (alle Pflanzen sind im selben Entwicklungsstadium), bietet sich ein Bild wie in Chromatogramm C.

Der Latex aller untersuchter Pflanzenteile enthält durchweg alle vier Hauptalkaloide, nur die Mengen variieren etwas aber nicht in auffallender Weise. Es scheint allerdings, als ob in der Wurzel der Codeingehalt höher liegt verglichen mit dem Sproßachsenbereich direkt oberhalb der Wurzelregion, was auf eine höhere Aktivität demethylierender Enzyme in diesem Sproßachsenbereich zurückzuführen sein könnte. Dies wäre auch eine Erklärung (neben der Abnahme des Latexflusses) für das Fehlen von Codein im Sproßachsenlatex nach Chromatogramm B.



-  Sichtbarmachung durch UV-Licht  
 Sichtbarmachung durch DRAGENDORFF-Reagenz

Abb. A : dünnschichtchromatographischer Nachweis der Opiumalkaloide

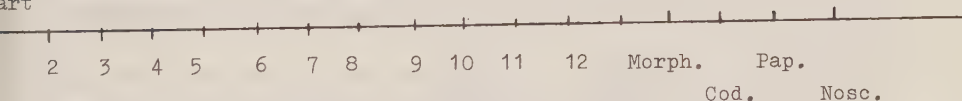
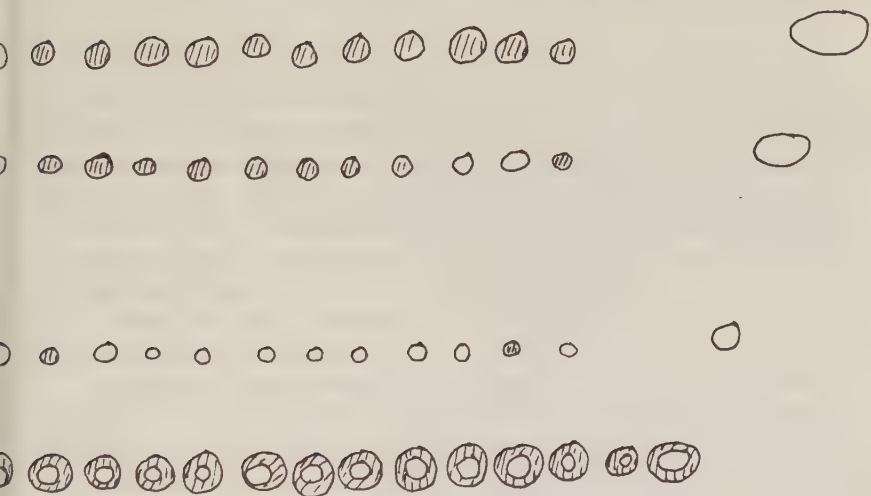


-  Sichtbarmachung durch UV-Licht  
 Sichtbarmachung durch DRAGENDORFF-Reagenz

Lage der Schnitt- bzw. der Entnahmeflächen:

- 1 = Wurzel (weitester Durchmesser)  
 2 = Sproßachse 2 cm über der Wurzel  
 3 = " 4 cm " " "  
 4 = " 6 cm " " "  
 5 = " direkt unterhalb der Knospe

Abb. B Latexuntersuchung, dünnschichtchromatographischer Nachweis der Alkaloide



Tragmenge: je 1  $\mu$ l Latex; je 10  $\mu$ l Vergleichsalkaloide

-  Sichtbarmachung durch UV-Licht
-  Sichtbarmachung durch DRAGENDORFF-Reagenz

ge der Schnitt- bzw. der Entnahmeflächen:

- = Wurzel (weitester Durchmesser) 7 = Sproßachse unterhalb des
- = Ansatzstelle des 1. Blattes 13. (letzten) Blattes
- (von unten nach oben gezählt) 8 = Ansatzstelle des 6. Blattes
- = Blütenknospe 9 = Sproßachse unterhalb des
- = Ansatzstelle des 2. Blattes 10. Blattes
- = Sproßachse direkt unterhalb 10 = Sproßachse unterhalb des
- der Knospe 8. Blattes
- = Ansatzstelle des 4. Blattes 11 = Sproßachse direkt über der Wurzel
- 12 = Sproßachse zwischen 6. und 7. Blatt

## 5. Der Alkaloidgehalt von Blattläusen auf *Papaver somniferum* und seine Bedeutung

Im Juni 1975 war auf den Mohnpflanzen ein starker Befall durch Blattläuse festzustellen. Anstatt mit Insektiziden zu sprühen, nahm ich diese sonst unerwünschte Begleiterscheinung der Arzneipflanzenkultur zum Anlaß, die Blattläuse auf einen eventuellen Gehalt an Alkaloiden zu untersuchen. Zwar war zunächst nicht zu erwarten, daß die Blattläuse aus der Mohnpflanze Alkaloide aufnahmen, da sie ja nach ZIEGLER (21) allein die Siebröhren ausbeuten, um so ihren Energiebedarf zu decken (Siebröhrensaft enthält bekanntlich Kohlenhydrate, bes. Saccharose). Immerhin war aber auch daran zu denken, daß die Blattläuse beim Einstechen in die Pflanze Alkaloide aufnehmen könnten, bezw. sogar den ebenfalls nährstoffreichen Milchsaft (Fett, Eiweiß, Zucker, Schleimstoffe) zufällig oder absichtlich verwerten.

Die Blattläuse wurden deshalb wie das Pflanzenmaterial aufbereitet und auf Alkaloide hin untersucht. Es zeigte sich, daß die Blattläuse dieselben Alkaloide enthielten, die in dem betreffenden Entwicklungsstadium in der Pflanze nachgewiesen werden konnten: Morphin, Papaverin und Noscapin, wobei Morphin mengenmäßig überwog.

Um die Frage zu klären, ob Blattläuse auch andere Nahrungsquellen als die Siebröhren ausnutzen, wurde eine mikroskopische Untersuchung der Tiere am Pflanzenmaterial vorgenommen.

Als Untersuchungsmaterial dienten von Blattläusen befallene Laubblätter von *Papaver somniferum*. Die Blattläuse wurden durch vorsichtiges Auftropfen von Essigsäureäthylester abgetötet. Dies geschieht so schnell, daß die Blattläuse meist nicht mehr in der Lage sind, ihre Saugrüssel aus der Nahrungsquelle zu entfernen. Das Blattmaterial mit Blattläusen wird sodann in Kunststoff eingebettet (siehe 6.6. Methacrylateinbettung) und mikroskopisch untersucht. Nach dieser Methode wurden ca. 10 Tiere analysiert. Aus den so entstandenen Schnittserien ließ sich der Weg des Blattlaussausrüssels im Pflanzengewebe gut verfolgen.

Der Stichkanal verläuft durch die Kutikula ins Gewebe und folgt dort überraschenderweise stets der Mittellamelle. Der Saugrüssel kann im Pflanzengewebe in alle Richtungen des Raumes geknickt und gebogen werden. Er wird von der Blattlaus auf dem kürzesten Wege an das Leitbündel herangeführt. Bei *Papaver somniferum* sind die einzelnen Elemente des Leitbündels und die angrenzenden Gewebe so angeordnet, daß von außen nach innen aufeinanderfolgen: Milchröhren, Siebröhren, Kambiumzone und Gefäße. (Sklerenchymatische Elemente fehlen in den Leitbündelsystemen der kleineren Blattnerven.) Der Endpunkt des Stichkanals im Phloembereich kann mit Sicherheit ausgemacht werden, denn hier befindet sich der Saugrüssel im Zellumen.

Zu den Abbildungen 29 bis 35:

Abb. 29

Am oberen Bildrand sind Kopf und Beine der Blattlaus zu sehen, die auf der Epidermis sitzt. Der Saugrüssel ist ins Gewebe eingeführt, er ist hier und auf den weiteren Abbildungen an seiner gelben Farbe zu erkennen. (Durch die Kunststoffeinbettung erscheint das Bild relativ kontrastarm, der Kunststoff hat zudem das Gewebe soweit durchdrungen, daß es im Parenchym zu Erscheinungen kommt, die wie Interzellularen wirken.)

Abb. 30 und 31:

Hier ist besonders gut zu sehen, wie die Blattlaus den Saugrüssel immer im Mittellamellenbereich führt.

Abb. 35:

Es wird deutlich sichtbar, daß der Endpunkt des Stichkanals erreicht ist, der Saugrüssel befindet sich im Zellumen einer Siebröhre.

Blattlaus

Blattepidermis

Blattlaus-  
kanüle

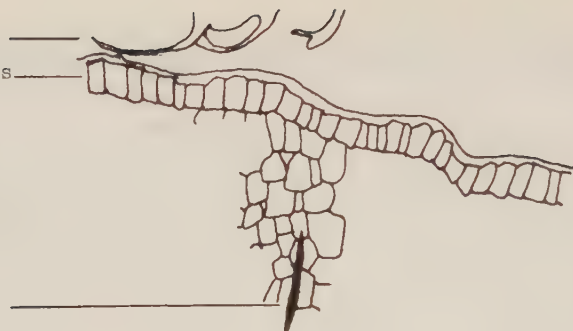


Abb. 29

Blattlaus-  
rüssel

Blattlaus-  
kanüle



Gefäßbereich

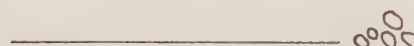


Abb. 30

Blattlaus-  
kanüle

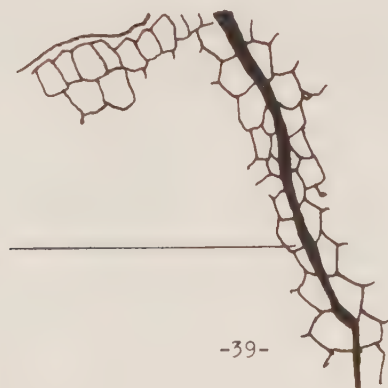


Abb. 31

Blattlaus-  
kanüle

Leitbündel-  
bereich

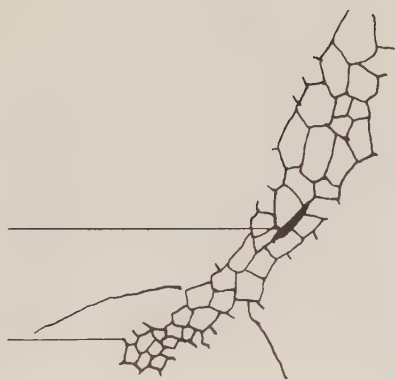


Abb. 32

Blattlaus-  
kanüle

Milchröhren

Siebröhren

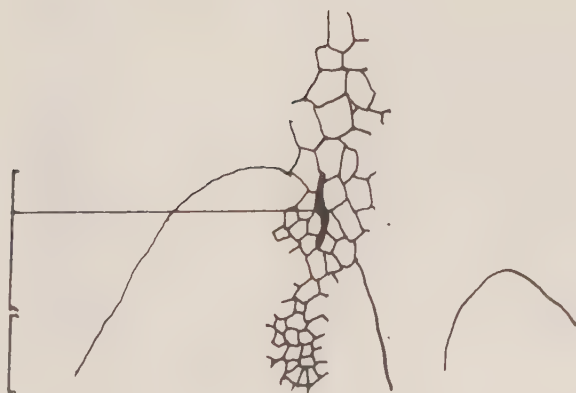


Abb. 33

Milchröhren

Blattlaus-  
kanüle

Siebröhren

Kambium-  
zone

Gefäße

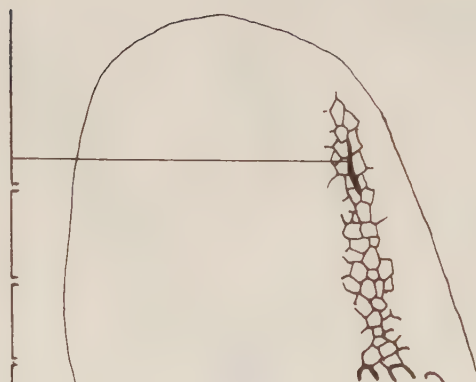


Abb. 34

Milchröhren

Blattlaus-  
kanüle

Siebröhren

Kambium-  
zone

Gefäße



Abb. 35

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Anwesenheit von Alkaloiden bei *Papaver somniferum* nicht auf das Milchröhrensystem beschränkt sein kann. Zwar sind die Alkaloide in den Milchröhren angereichert, es muß aber wohl ein Stoffaustausch mit benachbarten Geweben - wie den Siebröhren - stattfinden, denn die Blattläuse können die Alkaloide nur aus den Siebröhren aufgenommen haben. Ein weiterer Hinweis für einen Stoffaustausch (zwischen Siebröhren und benachbarten Geweben) sind die zusätzlichen Siebfelder in den Längswänden der Siebröhren, über die ein solcher Stoffaustausch erfolgen könnte.

Berücksichtigt man auch die Tatsache, daß im Samen, der keine Milchröhren enthält, Alkaloide auftreten, so ist anzunehmen, daß mehrere, unterschiedlich differenzierte Zelltypen befähigt sind, Alkaloide zu bilden und/oder in verschiedenem Maße zu speichern.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Herkunft und morphologische Merkmale der Versuchspflanzen

Die Samen, aus denen Pflanzen gezogen wurden, stammten aus dem Bestand des Botanischen Gartens der Universität Marburg. In den Jahren von 1974 bis 1976 wurde jeweils im Frühjahr (zwischen März und April) ein Versuchsfeld von ca. 20 qm -das entspricht etwa 500 bis 600 Pflanzen- im Freiland angelegt. Die vollentwickelten Pflanzen waren bis zu 1 m hoch und hatten durchschnittlich 15 Laubblätter. Sie gehörten zu einer purpurrot blühenden Varietät von *Papaver somniferum* mit dunkel blaugrau gefärbten Samen.

### 6.2. Aufbereitung von Pflanzen, Samen, Latex und tierischem Material zur phytochemischen Untersuchung

Pro Versuch wählte ich 10 bis 15 gleich gut entwickelte Pflanzen aus; die Laubblätter wurden von den Pflanzen abgetrennt und entsprechend ihrer Position an der Pflanze sortiert und beziffert, wobei die Bezeichnung fortlaufend von unten nach oben, d.h. von den älteren zu jüngeren Blättern, vorgenommen wurde (F1-F15; F = Folgeblatt). Keim- und Primärblätter wurden gesondert bezeichnet (KB und PB).

Die Blätter wurden bei 60°- 65° C im Trockenschrank getrocknet, im Exsiccator bei Zimmertemperatur nachgetrocknet und in einer Schlagkreuzmühle pulverisiert. Das Blattpulver wurde bis zur weiteren Bearbeitung im Exsiccator aufbewahrt.

Im Laufe der Vegetationsperiode entnahm ich dem Versuchsfeld vor der Blütezeit in jeder Woche Pflanzenproben, während der Blüte in Abständen von 24 und 48 Stunden (da zu diesem Zeitpunkt besonders starke Veränderungen im Alkaloidgehalt vorliegen) und nach dem Abblühen alle 14 Tage.

#### Keimpflanzen:

In geschlossenen Petrischalen von ca. 10 cm Durchmesser ließ ich Samen auf feuchtem Filtrierpapier, bei Tageslicht und Raumtemperatur keimen. Die Pflanzen ließen sich bei diesen Bedingungen maximal 10 Tage am Leben erhalten. Keimpflanzen wurden stets frisch verarbeitet.

#### Samen:

Samen wurden auf einer Filternutsche drei- bis viermal mit kleinen Anteilen Wasser und zweimal mit Methanol/Ammoniak 25% (98+2) gewaschen, um eventuell anhaftende Spuren von Milchsafte zu entfernen, in einer Schlagkreuzmühle zerkleinert und sofort weiter verarbeitet.

#### Tierisches Material:

Mohnpflanzen wurden durch Waschen in großen Bechergläsern von Blattläusen befreit und diese auf einer Filternutsche aufgefangen. Die Blattläuse wurden zwei- bis dreimal mit Wasser und einmal mit Methanol/Ammoniak 25% (98+2) gespült, um eventuell anhaftende Alkaloidspuren zu entfernen, und in einen Porzellanmörser überführt, wo sie mit Methanol/Ammoniak 25% (98+2) und etwas Sand zerkleinert und anschließend extrahiert wurden.

#### Latex:

Zur Latexentnahme ritzte ich die Pflanze mit einer Rasierklinge an und nahm den austretenden Milchsafte mit einer Auftragpipette auf. Der Milchsafte wurde in kleiner Menge (1-3  $\mu$ l) direkt auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und ohne weitere Behandlung mit dem Fließmittel nach RACZ chromatographiert.

### 6.3. Extraktion und Weiterverarbeitung

#### Drogenmaterial:

1,000-4,000 g Drogenmaterial wurden jeweils mit der zehnfachen Menge Extraktionsmittel (Methanol/Ammoniak 25% 98+2) während 24 Stunden durch Mazeration extrahiert.

Chlorophyll, das bei der Dünnschichtchromatographie stören würde, entfernt man bei einem pH von 2-3 mit Diäthyläther. Der chlorophyllfreien Lösung wird soviel Ammoniak 25% zugesetzt, bis ein pH von 7-9 erreicht ist. Man schüttelt die Alkaloidbasen mit Chloroform aus und entfernt dieses im Rotationsverdampfer. Der Rückstand wird in 1,00 ml Chloroform/Methanol (80+20) aufgenommen.

#### Frischmaterial:

Jeweils 10,0 g Frischpflanzenmaterial wird unter Zusatz von Seesand oder Quarzpulver in einem Porzellanmörser fein zerrieben; zur Fermentinaktivierung setzt man 96%-iges Äthanol zu (je g Pflanzenmaterial 1 ml).

Die Extraktion und Weiterverarbeitung erfolgt wie bei Drogenmaterial angegeben; ebenso verfährt man mit Samen und Tiermaterial.

#### 6.4. Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie

Von der nach Punkt 6.3. bereiteten Analysenlösung werden bei der qualitativen Dünnschichtchromatographie 10-100  $\mu$ l, bei der quantitativen Dünnschichtchromatographie 10  $\mu$ l (entsprechend 10-40 mg Drogenmaterial, bzw. 100 mg Frischpflanzenmaterial) auf Dünnschichtplatten oder -folien mittels einer HAMILTON-Kanüle aufgetragen und unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Platten: DC-Fertigplatten, MERCK, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>

DC-Fertigfolien aus Aluminium, MERCK, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>

Fließmittel: nach RÄTZ (20)  
Aceton-Xylol-Methanol-Ammoniak 25%  
(49,5 + 41,5 + 15 + 4)

Kammersättigung: 24 Stunden

Laufstrecke: 13 cm/ ca. 1 Stunde

Sichtbarmachung: nach Trocknen der Platte bzw. der Folie im Trockenschrank bei 40°C, 10 Minuten:

a) UV-Licht 365 nm: Morphin, Noscapin (Eigenfluoreszenz)  
254 nm: Morphin, Codein, Papaverin, Noscapin  
(Fluoreszenzlöschung)

b) DRAGENDORFF-Reagenz:

Lösung A: 0,85 g basisches Wismutnitrat wird in 10 ml Eisessig gelöst und mit 40 ml Wasser versetzt.

Lösung B: 8,0 g Kaliumjodid wird in 10 ml Wasser gelöst.

1 ml Lösung A wird mit 1 ml Lösung B gemischt unter Zusatz von 4 ml Eisessig und 20 ml Wasser.

Vergleichssubstanzen: auf jeder Platte je 10  $\mu$ l einer  
0,1%-igen Lösung von Morphin, Codein,  
Papaverin und Noscapin in Chloro-  
form/Methanol (80+20), entsprechend  
je 10  $\mu$ g.

Es wurden noch verschiedene andere Fließmittelsysteme geprüft,  
von denen jedoch keines gleich gute Ergebnisse lieferte wie das  
Fließmittel nach RACZ:

Fließmittelsysteme nach PREININGER und Mitarbeitern (22):

Cyclohexan/Diäthylamin (90+10)

Methanol/Diäthylamin (80+20)

Xylol-Methyläthylketon-Methanol-Diäthylamin  
(46 + 45 + 7 + 2)

Fließmittelsystem nach EL-KHEIR (23):

Toluol-Aceton-Äthanol-Ammoniak 25%  
(20 + 20 + 6 + 1)

### Quantitative Direktauswertung:

Auf die vorher markierten Startpunkte der Dünnschichtplatte werden abwechselnd 5  $\mu$ l, bzw. 10  $\mu$ l der nach 6.3. bereiteten Analysenlösung und -je nach dem zu erwartenden Gehalt an einem bestimmten Alkaloid (in einem Vorversuch ermittelt)- 1, 2, 3, 4, 5 und 10  $\mu$ l der Alkaloidvergleichslösung mittels HAMILTON-Spritze punktförmig aufgetragen; die Konzentrationen der verwendeten Standardlösungen waren:

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Morphin (als Hydrochlorid)   | 0,1 % |
| Codein (als Base)            | 0,1 % |
| Papaverin (als Hydrochlorid) | 0,1 % |
| Noscapin (als Hydrochlorid)  | 0,1 % |

### Halbquantitative Fleckauswertung:

Die Alkaloidflecke werden auf der Dünnschichtplatte durch Besprühen mit DRAGENDORFF-Reagenz sichtbar gemacht. Die Flecke werden ausgemessen (bei kreisrunden Flecken: Durchmesser; sonst Höhe x Breite) und der Gehalt wird durch Fleckgrößenvergleich mit Testflecken von definiertem Gehalt bestimmt.

### Quantitative Direktauswertung:

Die Alkaloidflecke werden auf der Dünnschichtplatte auf einem Kreutztisch am Spalt einer Quecksilberdampf-Lampe-Monochromator-Systeme vorbeigeführt und die Fluoreszenz bzw. Remission als Funktion des Ortes bestimmt und über einen Schreiber als Remissionsgrad-(Fluoreszenzgrad)-Ortskurve aufgezeichnet:

Meßgerät: Spektrodensitometer SD 3000 SCHOEFFEL-WEISS mit  
SDL 300 Density Computer, Fa. SCHOEFFEL-INSTRUMENT  
GmbH, 2351 Trappenkamp

### Meßtechnik für Morphin:

Morphin besitzt Eigenfluoreszenz und der Gehalt kann deshalb durch Fluoreszenzmessung im Einstrahlverfahren ermittelt werden.

Geräteeinstellung: Anregungswellenlänge: 350 nm  
Meßwellenlänge: 450 nm  
Monochromator: 2  
Abtastspalt: 2  
Range: 1,0  
Tischvorschub: 100 mm/min  
Scheibervorschub: 100 nm/min

Meßtechnik für Codein, Papaverin und Noscapin:

Codein und Papaverin fluoreszieren beide nicht, ihr Gehalt wird deshalb mittels Remissionsmessung im Zweistrahilverfahren bestimmt. Obwohl Noscapin Eigenfluoreszenz besitzt, ist es nicht möglich, den Gehalt über Fluoreszenzmessung zu bestimmen, weil sich durch die Bestrahlung während des Meßvorgangs die Fluoreszenz ständig ändert; andererseits ist die Fluoreszenzmessung wegen der größeren Empfindlichkeit der Remissionsmessung vorzuziehen.

Geräteeinstellung: wie bei Morphin, mit Ausnahme von:

Betriebswellenlänge: 270 nm  
(empirisch bestimmt)

Range: 0,4

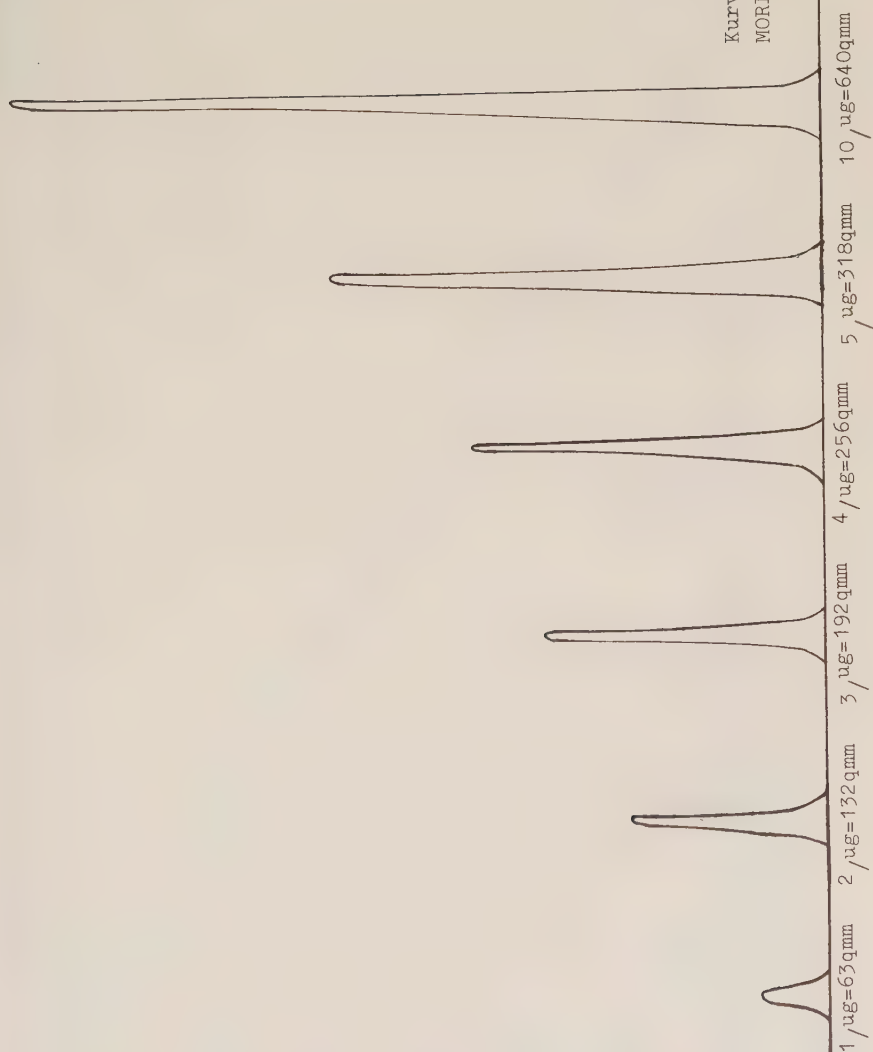
Auswertung:

Die Fläche unter der Kurve, die ein Maß für die Substanzmenge ist, wird durch das Produkt aus Höhe mal Halbwertsbreite berechnet. Der Gehalt wird ermittelt durch Vergleich der Flächengehalte von Vergleichssubstanzen und Probe und wird umgerechnet auf den %-Gehalt der getrockneten, gepulverten Droge.

Dieses Verfahren ermöglicht für Blattdrogenmaterial von Schlafmohn eine Gehaltsbestimmung bis hinunter zu 0,002 Gewichtsprozent bezogen auf Trockensubstanz. Die Nachweisgrenze wird auf  $\pm 0,001\%$  geschätzt.

Die beigefügten Kurvenbilder und daraus abgeleiteten Eichgeraden veranschaulichen die mit den Standardsubstanzen erhaltenen Ergebnisse.

Kurvenbilder  
MORPHIN



Fläche  
in qmm

700

600

500

400

300

200

100

Eichgerade MORPHIN

10 Substanzmenge in  $\mu\text{g}$

1

2

3

4

5

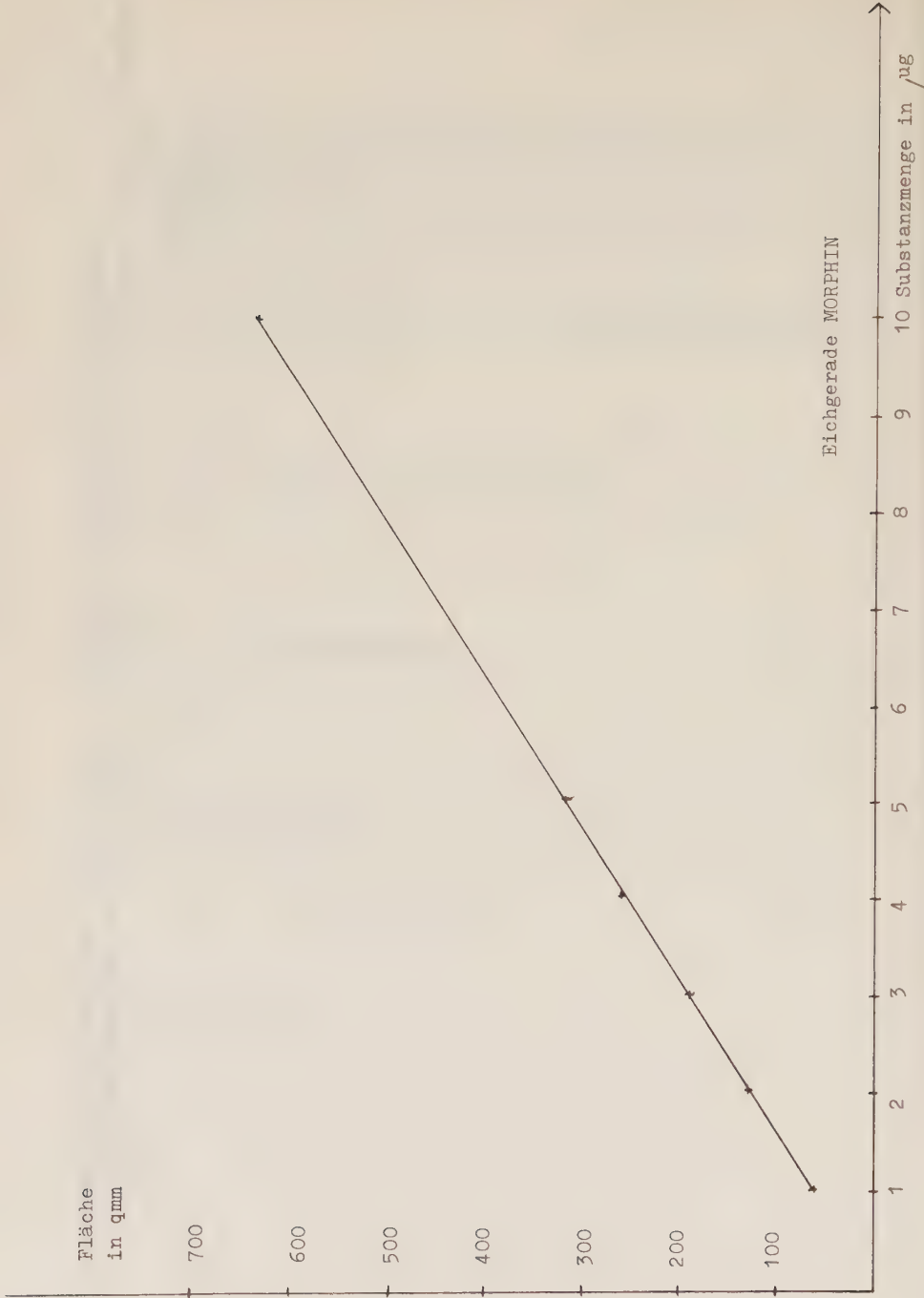
6

7

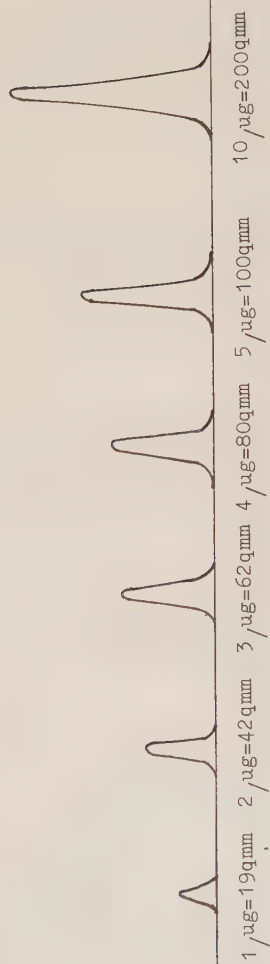
8

9

10



Kurvenbilder CODEIN



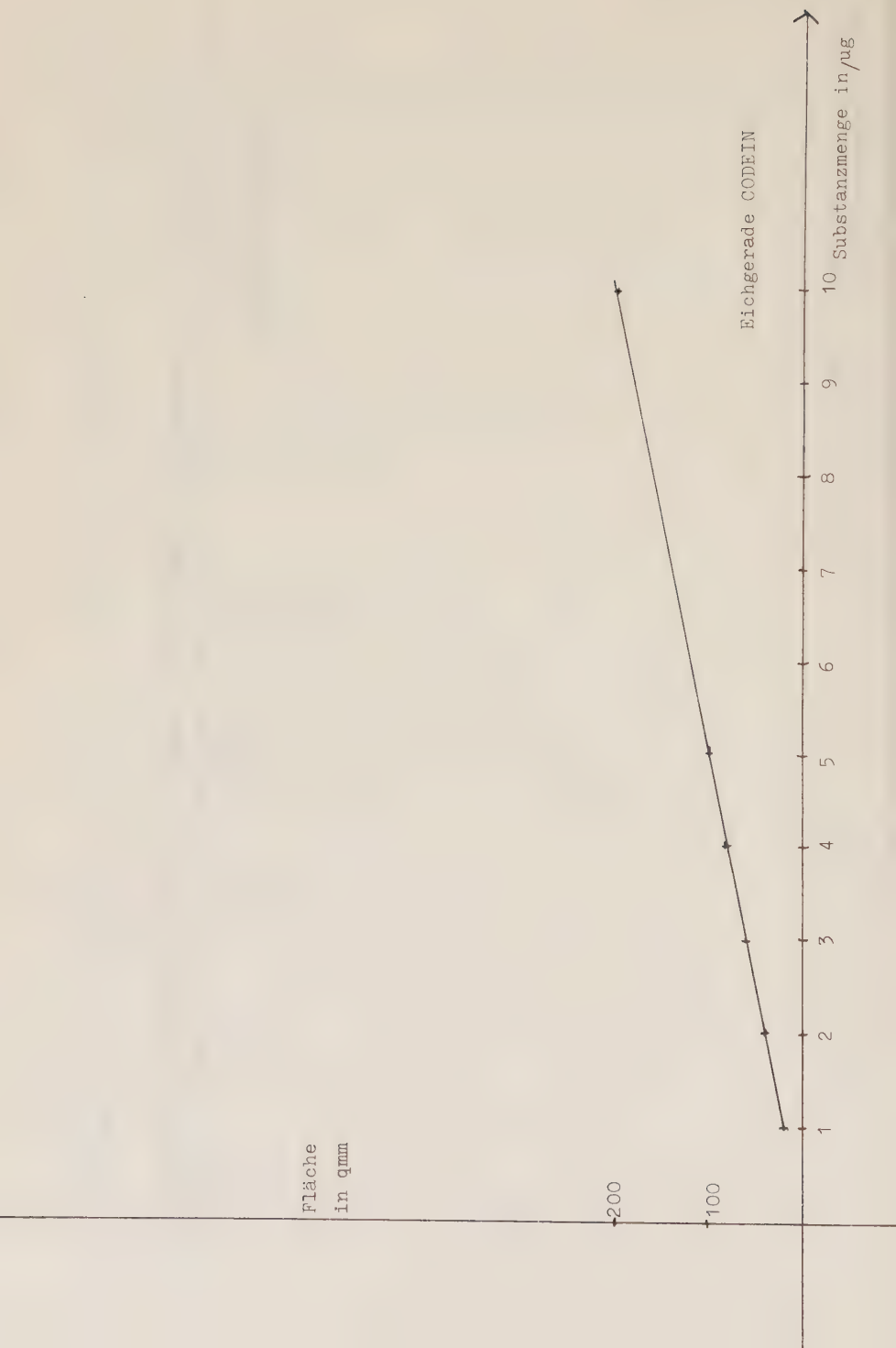
Fläche  
in qmm

200

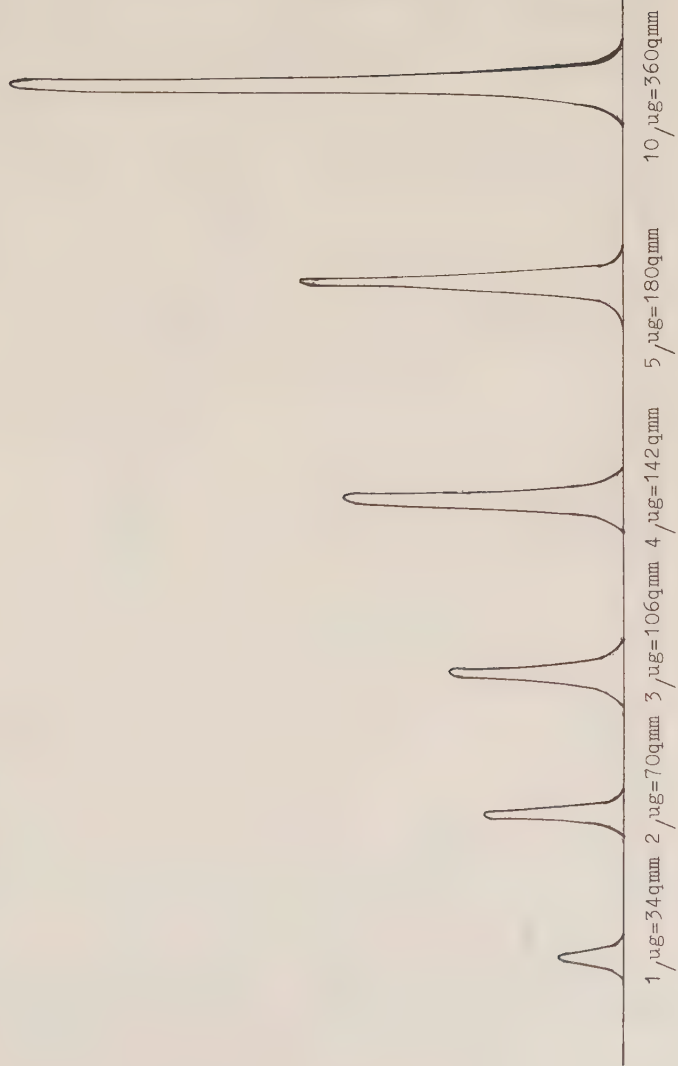
100

Eichgerade CODEIN

10 Substanzmenge in  $\mu\text{g}$



Kurvenbilder PAPAVERIN



Fläche  
in qmm

400

300

200

100

Eichgerade PAPAVERIN

1

2

3

4

5

6

7

8

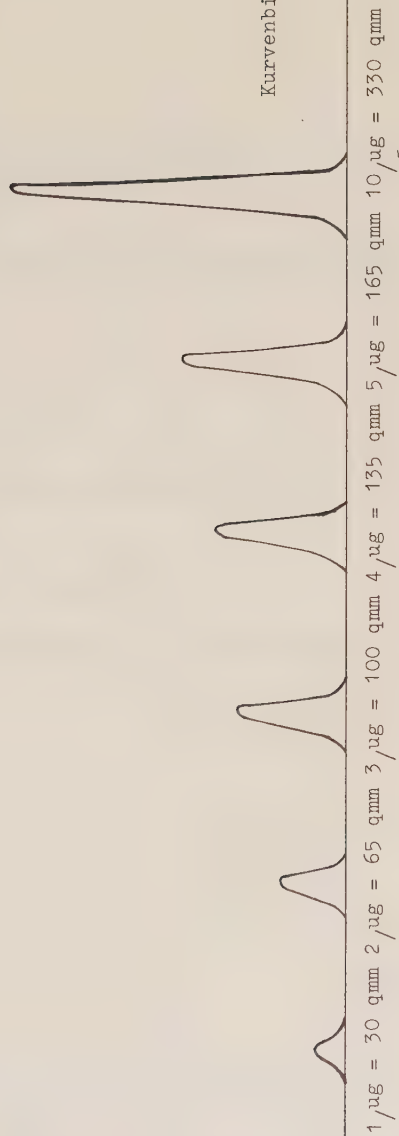
9

10

Substanzmenge in  $\mu\text{g}$



Kurvenbilder NOSCAPIN



Fläche  
in qmm

400

300

200

100

Eichgerade NOSCAPIN

Substanzmenge in  $\mu\text{g}$

10

9

8

7

6

5

4

3

2

1

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

# Zeichenerklärungen für die Tabellen:

KB: Keimblätter

PB: Primärblätter

F : Folgeblätter (gezählt wird vom Grunde der Pflanze aus zur Vegetationsspitze hin)

V : die Pflanze ist kurz vor dem Aufblühen, die Blütenknospe ist noch nickend

B : voll erblühte Pflanze

A : Pflanze kurz nach dem Abblühen

+ : noch wahrnehmbare Spuren des Alkaloids, aber nicht mehr densitometrisch meßbar

++: Alkaloidmengen zwischen + und 0,001%

0,0.. Zahlenangaben = Gehalt in % bezogen auf das Trockengewicht

MORPHIN

| Alter<br>in<br>Wochen | KB | PB    | F1    | F2    | F3    | F4    | F5    | F6    | F7    | F8    |
|-----------------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                     | +  | +     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2                     | +  | +     | +     | +     |       |       |       |       |       |       |
| 3                     | +  | +     | 0,002 |       | 0,002 | +     | +     | +     |       | +     |
| 4                     | +  | +     | +     | +     | 0,001 | 0,001 | 0,001 | +     | 0,001 | 0,002 |
| 5                     | +  | +     |       | +     | +     | ++    | ++    | +     | 0,001 | 0,003 |
| 6                     |    | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,003 |
| V                     |    | 0,001 | 0,005 | 0,001 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,006 | 0,007 | 0,003 |
| B                     |    | ++    | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| 7A                    | +  | +     | 0,002 | 0,001 | 0,003 | 0,004 | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| 8                     | +  | +     | 0,001 | ++    | 0,001 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,001 |
| 10                    |    |       | 0,001 | 0,003 | 0,006 |       |       |       | 0,001 | 0,001 |
| 12                    |    |       | ++    | ++    |       | 0,001 | 0,002 |       | 0,001 | 0,001 |
| 14                    |    |       | +     | ++    | 0,001 | 0,003 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,002 |

# MORPHIN

| Alter<br>in<br>Wochen | F9    | F10   | F11   | F12   | F13   | F14   | F15   |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                     |       |       |       |       |       |       |       |
| 2                     |       |       |       |       |       |       |       |
| 3                     |       |       |       |       |       |       |       |
| 4                     | +     | +     | +     | +     |       |       |       |
| 5                     | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,001 |       |       |       |
| 6                     | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,002 |
| V                     |       |       | +     |       |       |       | +     |
| B                     | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,008 | 0,001 |       |
| 7A                    | 0,004 |       | 0,005 | 0,006 | 0,008 | 0,005 |       |
| 8                     | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,006 |       | 0,002 |
| 10                    | 0,002 | 0,004 | 0,004 | 0,006 | 0,005 | 0,006 |       |
| 12                    | ++    | ++    | 0,001 | 0,003 | 0,004 | 0,007 |       |
| 14                    | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,004 |       |       |
| .                     |       |       |       |       |       |       |       |

## CODEIN

| Alter<br>in<br>Wochen | KB | PB | F1 | F2    | F3    | F4    | F5    | F6    | F7    | F8    |
|-----------------------|----|----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                     |    |    |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 2                     |    |    |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 3                     |    |    |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 4                     |    |    |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 5                     |    |    |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 6                     |    |    |    |       | +     | 0,001 | 0,001 | ++    | ++    | 0,001 |
| V                     |    | +  | +  |       | 0,001 | 0,002 | +     | +     | +     |       |
| B                     |    |    |    | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | ++    |
| 7A                    |    |    |    |       |       | +     | 0,001 | 0,001 | +     | +     |
| 8                     |    |    |    |       |       |       | 0,001 | +     | ++    | +     |
| 10                    |    | +  | +  | 0,002 | 0,001 |       |       |       | +     | +     |
| 12                    |    | +  | +  | +     | +     |       |       | ++    | +     | +     |
| 14                    |    |    |    |       |       | +     | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,002 |

## CODEIN

| Alter<br>in<br>Wochen | F9    | F10   | F11   | F12   | F13   | F14 | F15 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| 1                     |       |       |       |       |       |     |     |
| 2                     |       |       |       |       |       |     |     |
| 3                     |       |       |       |       |       |     |     |
| 4                     |       |       |       |       |       |     |     |
| 5                     |       |       |       |       |       |     |     |
| 6                     | +     | +     |       | 0,001 | 0,001 | +   | +   |
| V                     | +     |       |       |       |       |     |     |
| B                     | +     | ++    | +     | +     | +     |     |     |
| 7A                    | +     |       |       |       |       |     |     |
| 8                     | +     | +     | +     | +     | +     |     |     |
| 10                    | +     | +     |       |       |       |     |     |
| 12                    | +     | +     | +     | +     | +     | +   |     |
| 14                    | 0,001 | 0,003 | 0,002 |       |       |     |     |

# PAPAVEP III

Alter

in

Wochen

|    | KB    | PB    | P1    | P2    | P3    | P4    | P5    | P6    | P7    | P8    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | 0,001 | 0,001 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2  |       | +     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3  |       | +     | +     |       | +     | +     | +     | +     | 0,001 | 0,001 |
| 4  |       |       |       |       | 0,001 | ++    | 0,001 | +     | 0,001 | 0,001 |
| 5  |       |       | +     | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | ++    | 0,001 | 0,001 |
| 6  |       | +     | +     | +     | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,003 |
| V  |       | +     | +     | +     | +     | +     | 0,003 | 0,001 | 0,001 | 0,002 |
| B  |       | ++    | 0,001 | ++    | ++    | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,002 |
| 7A |       | 0,002 | +     | +     | +     | +     | +     | +     | 0,001 | 0,002 |
| 8  |       | +     | +     | +     | +     | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| 10 |       |       | ++    | 0,002 | 0,001 |       |       |       | 0,001 | 0,002 |
| 12 |       |       | ++    |       |       | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| 14 |       |       | 0,001 | ++    | ++    | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,002 |

# PAPAVÉRIN

| Alter<br>in<br>Wochen | F9    | F10   | F11   | F12   | F13   | F14   | F15   |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                     |       |       |       |       |       |       |       |
| 2                     |       |       |       |       |       |       |       |
| 3                     |       |       |       |       |       |       |       |
| 4                     | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,002 |       |       |       |
| 5                     | ++    | 0,001 | 0,002 | 0,003 |       |       |       |
| 6                     | 0,005 | 0,003 | 0,004 | 0,003 | 0,004 | 0,003 | 0,002 |
| V                     | 0,004 | 0,004 | 0,005 |       |       |       |       |
| B                     | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,003 | 0,003 | +     | 0,006 |
| 7A                    | 0,002 |       | 0,002 | 0,002 | 0,004 | 0,003 |       |
| 8                     | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,003 |       |       |
| 10                    | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,003 | 0,005 |
| 12                    | 0,002 | 0,001 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,003 |       |
| 14                    | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,002 |       |       |

# NOSCAPIN

| Alter<br>in<br>Wochen | KB | PB    | F1 | F2    | F3    | F4    | F5    | F6    | F7    | F8    |
|-----------------------|----|-------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                     | +  | 0,001 |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 2                     |    | +     |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 3                     |    |       |    |       |       |       |       |       |       |       |
| 4                     |    |       |    |       | 0,001 | 0,001 | 0,002 | +     | 0,004 | 0,007 |
| 5                     |    |       |    | +     | +     | +     | 0,002 | ++    | 0,002 | 0,002 |
| 6                     |    | +     | +  | +     | +     | 0,001 | 0,003 | 0,001 | 0,004 | 0,006 |
| V                     |    |       | +  | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,006 | +     | 0,005 |
| B                     |    |       |    |       | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,004 | 0,006 | 0,007 |
| 7A                    |    |       |    | +     | +     | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,004 | 0,005 |
| 8                     |    |       | +  | +     | +     | 0,001 | 0,003 | 0,003 | 0,004 | 0,002 |
| 10                    |    |       |    | +     | 0,001 |       |       |       | 0,002 | 0,003 |
| 12                    |    |       |    | +     | +     | 0,001 | 0,004 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| 14                    |    |       |    |       |       | +     | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,002 |

# NOSCAPIN

| Alter<br>in<br>Wochen | F9    | F10   | F11   | F12   | F13   | F14   | F15 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| 1                     |       |       |       |       |       |       |     |
| 2                     |       |       |       |       |       |       |     |
| 3                     |       |       |       |       |       |       |     |
| 4                     |       |       |       |       |       |       |     |
| 5                     | +     | +     | +     | +     |       |       |     |
| 6                     | 0,004 | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,004 | 0,002 |     |
| V                     | 0,005 | +     | +     |       |       |       |     |
| B                     | 0,004 | 0,004 | 0,001 | 0,007 | 0,006 | 0,004 | +   |
| 7A                    | 0,005 |       | 0,005 | 0,007 | 0,007 | 0,008 |     |
| 8                     | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | +     |       |     |
| 10                    | 0,002 | 0,001 | +     | +     | +     | +     | +   |
| 12                    | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,001 |     |
| 14                    | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |       |     |

## 6.5. TAS-Verfahren nach STAHL (24)

Nach Versuchen von STAHL, der das TAS-Verfahren zur Schnellanalyse von Opiumproben heranzieht -jedoch nur qualitativ-, wurde der Versuch gemacht, das TAS-Verfahren (unter genau festgelegten Bedingungen) auch für die quantitative Analyse von Blattmaterial des Schlafmohns einzusetzen.

Jeweils 0,4000 g Blattdrogenmaterial wird in einem Spezialofen in einer Patrone erhitzt; die austretenden Stoffe werden direkt auf Dünnschichtplatten aufgedampft und chromatographiert (siehe 6.4.). Es wurde mit Aufdampftemperaturen von 220°, 235° und 250°C gearbeitet. Die Aufdampfdauer variierte von 30 Sekunden über 60 Sekunden bis 120 Sekunden.

Da für die Analyse von Opiumproben nach dem TAS-Verfahren bereits die Hauptalkaloide als Reinsubstanzen getestet worden waren, verzichtete ich auf Proben mit Reinsubstanzen.

Die einzelnen Alkaloide verhielten sich nach Aufdampfen mittels TAS-Ofen und Chromatographieren wie folgt:

Morphin: ist unter den hier gewählten Bedingungen nicht auf der Dünnschichtplatte nachzuweisen

Codein: ist identifizierbar

Papaverin: statt Papaverin ist ein Fleck mit etwas höherem  $R_f$ -Wert als Papaverin nachzuweisen

Noscapin: ist sehr gut auf der Dünnschichtplatte nachzuweisen

Da die vier Alkaloide nach dem TAS-Verfahren ein sehr unterschiedliches Verhalten zeigen und die Ergebnisse schwer zu reproduzieren sind, ist das TAS-Verfahren im Falle von Blattdrogenmaterial des Schlafmohns nicht für eine Mehrkomponentenanalyse geeignet.

## 6.6. Mikrotechniken und Mikroskopverfahren

### Fixiermethode:

Die Fixierung erfolgt über ein Fixiergemisch aus:

Äthanol 70%-Formaldehyd 35%-Eisessig (90 + 5 + 5)

= AFE-Gemisch

Dieses Gemisch hat folgende Eigenschaften:

- die Pflanzenteile sind in diesem Gemisch jahrelang haltbar
- das Gemisch wirkt aufhellend
- die Färbbarkeit der Objekte wird kaum beeinträchtigt
- die Zellwände quellen nicht auf
- der Kontrast des Mikroskopbildes wird verbessert, weil es zur Koagulation des Milchsafte in den Milchröhren kommt

Nach 24 Stunden Aufbewahrung im Gemisch sind die Pflanzenteile soweit fixiert, daß sie weiterbehandelt werden können.

### Schnittmethoden:

#### Handschnitte:

Zum Handschneiden benutzte ich Rasierklingen, die häufig ausgewechselt wurden. Es wurde nicht vorbehandeltes Frischmaterial oder fixiertes Material geschnitten.

#### Mikrotomschnitte:

Vor dem Schneiden müssen die Objekte eingebettet werden, d.h. mit einer Flüssigkeit durchtränkt werden, die später erstarrt, sodaß man einen Körper von gleichmäßiger Festigkeit erhält, der dann mit dem Mikrotom geschnitten werden kann.

Die Paraffineinbettung ist in der botanischen Mikrotechnik die gebräuchlichste Methode. Die zu untersuchenden Gewebe werden zunächst entwässert, das geschieht durch Aufenthalt in verschiedenen "Alkoholstufen" aufsteigender Konzentration. Da das Pflanzenmaterial mit AFE fixiert worden war (Alkoholstufe 70%), wurde aufeinanderfolgend mit 75%-, 80%-, 85%-, 90%-, 96%-igem Alkohol entwässert. Der Aufenthalt in jeder Alkoholstufe betrug 4-5 Stunden.

### Entwässerung mit Glycerin:

Diese Methode sollte schonender sein als die Entwässerung mit Alkohol. Die Objekte werden in ein Becherglas gegeben, das wasserhaltiges Glycerin enthält (10 Teile Glycerin und ein Teil Wasser). Nach etwa einer Woche Stehenlassen an einem staubgeschützten Ort werden die Objekte in absoluten Alkohol eingebracht.

### Aufhellung:

Als Aufhellungsmittel wird Xylol benutzt, das drei Vorteile bietet:

- AFE-fixierte Objekte werden durch Xylol nicht beeinträchtigt
- der Endpunkt der Aufhellung ist gut sichtbar, weil das Pflanzengewebe glasartig durchsichtig wird
- Paraffin ist in Xylol gut löslich

Die Aufhellung muß ebenfalls stufenweise erfolgen, um eine Schädigung des Gewebes durch Konzentrationsausgleichsströmungen zu vermeiden. Man läßt deshalb das Material Alkohol-Aufhellungsmittel-Konzentrationsstufen durchlaufen -analog der Entwässerung-, bis das Material in reines Aufhellungsmittel gebracht werden kann. Die Mischungsverhältnisse sind aufeinanderfolgend:

Alkohol 96%/Xylol (3+1, 1+1, 1+3)

Die Verweildauer in den Gemischen beträgt jeweils 4-5 Stunden.

### Infiltration mit Paraffin:

Das Material wird in eine kaltgesättigte Lösung von Paraffin in Xylol eingebracht, danach in eine auf 40°C erhitzte, gesättigte Lösung (Verweildauer jeweils 4-5 Stunden). Die Infiltration mit reinem Paraffin wird in einem Trockenschrank mit Lüftung und automatischer Temperaturregelung vorgenommen. (HERAEUS, Baureihe FT 420 mit elektronischem Regler TRE)

Die Temperatur wird während der Infiltration um  $5^{\circ}\text{C}$  höher gehalten, als der Schmelzpunkt des Paraffin ist. (Paraffin Blockform für die Histologie, MERCK, Erstarrungspunkt  $57^{\circ}\text{--}60^{\circ}\text{C}$ , Art. 7163)

Das Material wird in kleine Bechergläser mit flüssigem Paraffin eingebracht, das noch zweimal -jeweils nach einer Verweildauer von 4-5 Stunden- gewechselt wird. Das Material bleibt solange in der letzten Portion Paraffin, bis kein Geruch nach Xylol mehr wahrnehmbar ist.

#### Aceton-Infiltrationsmethode:

Um die ziemlich aufwendige Infiltrationsmethode mit Xylol abzukürzen, wurde der Versuch mit der Aceton-Infiltrationsmethode unternommen. Aceton löst Paraffin zwar nur in Spuren, hat aber die Eigenschaft, im selben Maß aus dem Material zu diffundieren, wie Paraffin nachströmt, sodaß es nicht zu Konzentrationsausgleichsströmungen kommen kann. Diese Methode ist aber nur anwendbar, wenn man Paraffin benutzt, das genau bei  $60^{\circ}\text{C}$  schmilzt. Die entwässerten Objekte werden aus der letzten Alkoholstufe in eine Mischung aus absolutem Alkohol und Aceton (1+1) gebracht und verbleiben 4-5 Stunden darin. Danach bringt man sie für jeweils 4-5 Stunden in zwei Portionen reines Aceton und dann in flüssiges Paraffin von  $70^{\circ}\text{C}$  (Trockenschrank). Sie bleiben solange im Paraffin, bis kein Acetongeruch mehr wahrnehmbar ist.

#### Einbettung:

Eingebettet werden die Objekte in kleine, dünn mit Glycerin ausgestrichene Petrischalen. Da der Einbettungsvorgang in der Wärme verlaufen muß, werden alle Arbeitsgeräte im Trockenschrank vorgewärmt, um ein vorzeitiges Erstarren des Paraffins zu verhindern. Das flüssige Paraffin gießt man in die Petrischalen, überträgt die Objekte mit Pinzette und Präpariernadel und orientiert sie im Paraffin. Die Petrischalen hält man bei  $4\text{--}5^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank

und bringt das Paraffin zum Erstarren; danach lassen sich die Paraffinblöcke leicht aus den Petrischalen lösen und sind fertig zum Schneiden mit dem Mikrotom, ohne vorher aufgeblockt werden zu müssen. Harte, hoch schmelzende Paraffinsorten -wie die verwendete- verformen sich in der Einspannvorrichtung des Mikrotoms nicht. Benutzt man weichere Paraffinsorten mit niedrigerer Schmelztemperatur, so müssen die Paraffinblöcke auf Holz- oder Kunststoffklötzchen aufgeschmolzen -aufgeblockt- werden. Die Paraffinblöcke werden mit einem Schlittenmikrotom geschnitten (REICHERT Austria Nr. 305925) mit einem Stahlmesser (b, R.JUNG AG, Heidelberg), die Schnittdicke variiert zwischen 5, 10, 15 und 20  $\mu$ m.

#### Histowachseinbettung:

Histowachs oder Carbowachs ist Polyäthylenglycol mit einem Molekulargewicht von 1000 und mehr. Der Vorteil von Histowachseinbettungen liegt darin, daß eine Entwässerung der Objekte entfallen kann.

Nach dem Fixieren mit AFE wäscht man die Objekte mit Wasser aus und bringt sie in ein Becherglas ein, in dem sich eine 20%-ige Lösung von Polyäthylenglycol (MG 6000-7000, Schmelzintervall  $60^{\circ}$ - $63^{\circ}$ C) in Wasser befindet. Der Flüssigkeitsstand wird mit Glasschreiber markiert und während vier Tagen im Trockenschrank bei  $60^{\circ}$ C auf ein fünftel des Volumens eingedickt. Danach überträgt man die Objekte für 24 Stunden bei  $60^{\circ}$ C in reines, geschmolzenes Histowachs, gießt die Schmelze in gefaltete Aluminiumformen und bringt sie -analog dem Paraffinverfahren- bei  $4-5^{\circ}$ C zum Erstarren, wobei der Erstarrungsprozeß ca. 14 Tage in Anspruch nimmt.

## Weiterverarbeitung der Schnitte:

Da das Paraffin bei der mikroskopischen Untersuchung stört, muß es vor dem Mikroskopieren entfernt werden. Zum Weiterverarbeiten werden die Schnitte zunächst aufgeklebt. Als Klebemittel wird Glycerin/Gelatine ("Haupt's Adhäsivum") benutzt:

1 g Gelatine (für die Mikrobiologie, MERCK, Art. 4070) wird mit 100 ml Wasser bei 30°C im Wasserbad gelöst; die Lösung wird mit 15 ml Glycerin und 2 g Phenol -als Antiseptikum- versetzt.

### Aufklebetechnik:

Auf saubere Objektträger wird gleichmäßig und dünn mit der Fingerkuppe Klebemittel aufgetragen. Um eine völlig gleichmäßige und "hauchdünne" Klebefläche zu erhalten, streicht man mit dem Handballen danach über den Objektträger. Auf die so vorbereiteten Objektträger wird je ein Tropfen destilliertes Wasser gegeben, auf den Wassertropfen werden die Paraffinschnitte mit der Pinzette aufgebracht, sodaß sie mit der glänzenden Unterseite auf dem Wassertropfen schwimmen. Durch vorsichtiges Erwärmen streckt man die Schnitte, ein Vorgang, der sich gut mit bloßem Auge beobachten läßt. Nach dem Abkühlen und Trocknen sind die so präparierten Schnitte über Jahre haltbar.

Zur mikroskopischen Untersuchung werden die Schnitte mit Xylol gewaschen, getrocknet und mit Einschlußmittel behandelt.

## Gefriermikrotomschnitte:

Hierfür stehen 2 Verfahren zur Auswahl: einerseits werden die Pflanzen direkt auf dem Schneidetisch eingefroren, in einem anderen werden sie vorher mit dem Einbettungsmittel infiltriert.  
Methode 1:

Das Pflanzenmaterial wird in wenigen Tropfen Einbettungsmittel auf dem Schneidetisch eingefroren. Als Einbettungsmittel dient "AMES embedding medium". Man überträgt die Schnitte mit einem feinen Pinsel auf Objektträger und untersucht sie mikroskopisch in Glycerin/Wasser (1+1). Selbst bei diesem sehr schonenden Verfahren zerreißt das Gewebe von Keimpflanzen sehr häufig. Um das

Zerreißen der Schnitte zu verhindern, wird sowohl die Einfriertemperatur variiert als auch die Schneidetemperatur: in Intervallen von jeweils  $5^{\circ}\text{C}$ :

Einfriertemperatur von  $-30^{\circ}\text{C}$  bis  $-5^{\circ}\text{C}$

Schneidetemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $-5^{\circ}\text{C}$

Bei einer Einfriertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  und einer Schneidetemperatur von  $-15^{\circ}\text{C}$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$  (bei  $15\text{ }\mu\text{m}$  Schichtdicke) wird nur bei Pflanzen ab vier Wochen Lebensalter das Zerreißen des Gewebes verhindert,

#### Methode 2:

Um das Pflanzengewebe noch mehr zu schonen, wird es mit dem Einbettungsmittel infiltriert. Dazu läßt man das Pflanzenmaterial in verschließbaren Glasgefäßen bei Raumtemperatur im Einbettungsmittel stehen. Ein gutes Durchdringen mit dem Einbettungsmittel ist nach ungefähr einer Woche erreicht. Das Pflanzenmaterial wird im Einbettungsmittel eingefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  geschnitten.

#### Methacrylateinbettung:

Zur Herstellung von sehr dünnen Schnitten (Dicke  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), die durch Materialien unterschiedlicher Härte -Zellulose von Pflanzen und Chitin von Insekten- geführt werden sollen, wird eine Kunststoffeinbettung vorgenommen.

Die entwässerten Objekte werden in das flüssige Methacrylatmonomer eingebracht; die Polymerisation erfolgt mit Hilfe eines Polymerisationsbeschleunigers (Dichlorbenzolperoxid) in der Wärme bei  $50^{\circ}\text{C}$ . Nach ungefähr 12 Stunden ist die Polymerisation soweit fortgeschritten, daß die Kunststoffblöcke hart genug zum Schneiden sind. Zum Schneiden wird ein Rotationsmikrotom mit Stahlmesser benutzt, die Schnitte auf Objektträger gebracht, durch vorsichtiges Erwärmen gestreckt und ohne Einschlußmittel mit Deckgläsern versehen, die an den Rändern sorgfältig fixiert werden.

Das Material wird dazu wie folgt vorbereitet:

Es werden Blätter von *Papaver somniferum* ausgewählt, die von einer möglichst großen Anzahl von Blattläusen befallen sind. Die Blattläuse werden durch vorsichtiges Auftropfen von Essigsäureäthylester abgetötet, die Blätter mit den Blattläusen in kleine Stücke von ungefähr  $0,5 \times 1,0$  cm zerteilt und in Methacrylat eingebettet.

Das Kunststoffblöckchen wird mit einem Stereomikroskop auf Abschnitte hin untersucht, an denen Tier und Pflanze so zueinander orientiert sind, daß sie im fertigen Schnitt gleich gut zu beobachten sind.

Hat man unter dem Stereomikroskop eine geeignete Schnittebene gefunden, wird das Kunststoffblöckchen entsprechend in die Einspannvorrichtung des Rotationsmikrotoms geklemmt. Über Schnittserien mit einer Schnittdicke von  $5\text{ }\mu\text{m}$  wird der Verlauf des Blattlausrüssels (Durchmesser ca.  $2\text{ }\mu\text{m}$ ) im Pflanzengewebe unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Um dem Verlauf des Rüssels in allen Richtungen des Raumes folgen zu können, muß das Kunststoffblöckchen häufig unter dem Stereomikroskop neu orientiert werden und wie oben beschrieben bearbeitet werden.

## Färbemethoden:

Um in pflanzlichen Geweben bestimmte Strukturen hervorzuheben, die sich im natürlichen Zustand kaum von ihrer Umgebung abheben, setzt die botanische Mikrotechnik verschiedene Färbemethoden ein. Je nach Wahl der Farbstoffe und Lösungsmittel können Zellwandbestandteile und/oder Zellinhaltsstoffe selektiv angefärbt werden.

### Färben mit Jodlösung:

Mit AFE fixierte Schnitte, die mit Wasser gewaschen werden, schließt man in wenige Tropfen alkoholische Jodlösung ein und mikroskopiert:  
die Schnitte färben sich gelb-braun, Zellwände und Zellinhaltsstoffe erscheinen kontrastreicher.

### Zellulosenachweis:

Zur Feststellung, ob wesentliche Unterschiede im Zellwandaufbau vorhanden sind, wird auf Zellulose und Lignin geprüft. Diese Nachweise lassen sich an AFE-fixierten Schnitten nicht durchführen, es muß Frischpflanzenmaterial verwendet werden.

Die Schnitte werden zehn Minuten in Lugolsche Lösung gelegt und auf einem Objektträger in dieser Lösung eingeschlossen. Man saugt zwischen Deckglas und Objektträger verdünnte Schwefelsäure hindurch und mikroskopiert sofort:

Zellulosewände erscheinen blau, lignifizierte Wände gelb.

### Ligninnachweis:

Nacheinander läßt man eine alkoholische Phloroglucinlösung und Perchlorsäure auf das Objekt einwirken. Es färben sich nur verholzte Gefäße und Sklerenchymfasern rot an.

### Safranin-Lichtgrün-Färbung:

1 g Safranin T "RIEDEL-DE HAEN" wird in 100 ml Äthanol 50% gelöst, die Lösung wird filtriert und ist dann gebrauchsfertig. Die AFE-fixierten Schnitte werden mit Äthanol 90% ausgewaschen und kommen für 24 Stunden in die Safraninlösung. Danach werden sie solange mit Wasser gewaschen, bis das Wasser farblos ist. Bevor sie in die Lichtgrünlösung übertragen werden, spült man sie kurz mit Äthanol 90%.

Für die Lichtgrünlösung löst man 0,5 g Lichtgrün (gelblich, MERCK, Art. 1315) in 100 ml Äthanol 50%.

Die Schnitte verbleiben eine Minute in der frisch zubereiteten Lösung, anschließend werden sie mit Isopropanol gespült und in Entellan<sup>®</sup> eingeschlossen.

Zytoplasma und Zellulosewände erscheinen grün, verholzte Zellwände rot. Der Zellinhalt von Milchröhren, Siebröhren und benachbarten Parenchymzellen erscheint einheitlich grün.

### Safranin-Fast Green-Färbung:

Anstelle von Lichtgrün wird eine 0,1%-ige Lösung von Fast Green, FCF, CHROMA, 1 A 304, in Äthanol 90% benutzt. Ein kurzes Eintauchen der Schnitte in die Fast Green-Lösung reicht zum Färben aus, da Fast Green sehr viel schneller färbt als Lichtgrün. Durchführung und Ergebnis entsprechen der Safranin-Lichtgrün-Färbung.

### Färbung nach WIMALARATNA (25)

Simultanfärbung für junge Gewebe, ursprünglich für Milchröhren von Hevea empfohlen:

|                             |                   |      |
|-----------------------------|-------------------|------|
| Ölrot 4 B "CHROMA" 1 A 258  | 2%                | 6 ml |
| Lichtgrün "MERCK" Art. 1315 | 2%                | 4 ml |
| Safranin T "RIEDEL-DE HAEN" | 10%               | 2 ml |
| Anilinsulfat                | 2%                | 1 ml |
| Lösungsmittel:              | absoluter Alkohol |      |
| Färbedauer:                 | 90 Minuten        |      |

AFE-fixiertes Pflanzenmaterial wird mit absolutem Alkohol gewaschen und gefärbt.

Die Schnitte färben sich einheitlich grün, nur Sklerenchymfasern erscheinen gelblich.

Simultanfärbung für ältere Gewebe:

Ölrot 4 B "CHROMA" 1 A 258 2% 2 ml

Methylgrün "MERCK" Art. 1314 1% 3 ml

Lichtgrün "MERCK" Art. 1315 2% 3 ml

Anilinsulfatlösung, gesättigt 2 ml

Lösungsmittel und Färbedauer entsprechen der Färbung für junge Gewebe.

Die Schnitte färben sich einheitlich grün-blau, Lignineinlagerungen erscheinen dunkelrot.

Variationen:

Ölrot-Lichtgrün-Färbung:

Die Konzentrationen sind wie bei WIMALARATNA (25) angegeben.

Ergebnis: wie bei der Simultanfärbung für junge Gewebe.

Sukzedan- statt Simultanfärbung:

|                            |    |      |                       |
|----------------------------|----|------|-----------------------|
| Ölrot 4 B "CHROMA" 1 A 258 | 2% | 2 ml | 90 Minuten Färbedauer |
|----------------------------|----|------|-----------------------|

|                             |    |      |       |
|-----------------------------|----|------|-------|
| Methylgrün "MERCK" Art.1314 | 1% | 3 ml | 5 " " |
|-----------------------------|----|------|-------|

|                             |    |      |        |
|-----------------------------|----|------|--------|
| Lichtgrün "MERCK" Art. 1315 | 2% | 3 ml | 10 " " |
|-----------------------------|----|------|--------|

Ergebnis: kein Unterschied zur Simultanfärbung.

Ölblau-Färbung nach FAIRBAIRN und KAPOOR (13)

Frischmaterial wird in 50%-igem Alkohol eingelegt und mit einer gesättigten Lösung von Ölblau N "CHROMA" 1 A 232 gefärbt.

Das Pflanzenmaterial nimmt den Farbstoff nur sehr schwer an, nach mehreren Stunden kommt es zu einer einheitlichen Hellblaufärbung der Schnitte.

## Kallosefärbung nach ZACH (26)

### Färbelösungen:

- (A) 1 g Eosin "MERCK" Art. 1345 in 100 ml Wasser
- (B) 1 g Anilinblau WS "MERCK" Art. 1275 in 100 ml Wasser;  
dieser Lösung werden 20 Tropfen Eisessig zugesetzt.

Zum Gebrauch werden 5 ml Lösung (A) mit 1 ml Lösung (B) gemischt. Frisches oder AFE-fixiertes Material wird mit Wasser gewaschen und 10 Minuten gefärbt. Danach spült man erst mit Wasser, dann mit Isopropanol und behandelt die Schnitte mit Einschlußmedium.

### Längsschnitte:

Sklerenchymfasern und Gefäße erscheinen rötlich, der Milchröhreninhalt hellblau, Siebplatten violett und Zellulosewände blau.

### Querschnitte:

Sklerenchymfasern und Gefäße erscheinen rot, Milchröhren farblos bis hellblau, Siebplatten violett und Zellulosewände blau.

### Kontrastierungsmethoden:

Neben Färbemethoden lassen sich Zellwände und Zellinhalt noch auf andere Weise sichtbar machen.

#### AFF-Fixierung:

Durch die AFF-Fixierung wird der Milchsaft in den Milchröhren koaguliert und läßt sich mikroskopisch an seiner granulären Struktur erkennen.

#### Aufhellung mit Chloralhydrat:

Schnitte von Frischmaterial werden für 1-2 Stunden in Chloralhydrat gelegt, mit Isopropanol ausgewaschen und mit Einschlußmittel versehen. Bei diesem Verfahren treten die Siebfelder, die in die Tangentialwände der Siebröhren eingelassen sind, besonders hervor.

#### Fluoreszenz-Mikroskopie:

Mit dem Gefriermikrotom hergestellte Schnitte werden in Glycerin/Wasser (1+1) eingeschlossen und mit UV-Licht auf unterschiedliche Primärfluoreszenz untersucht.

Da die Milchröhren in unmittelbarer Nachbarschaft von verholzten Elementen liegen, überstrahlt die leuchtend gelbe Primärfluoreszenz verholzter Gewebe den ganzen Schnitt.

#### Interferenzkontrast-Mikroskopie:

Zur Interferenzkontrast-Untersuchung (INKO-Untersuchung) wird das Verfahren nach NOMARSKY benutzt. Mit Hilfe dieser Methode erscheinen Objekte, die sich von ihrer Umgebung durch den Brechungsindex unterscheiden, unter dem Mikroskop auf der einen Seite hell und auf der anderen Seite dunkel, sodaß ein reliefartiger, sehr plastischer Eindruck der Objekte entsteht. Dieser Effekt wird durch zwei WOLLASTON-Prismen hervorgerufen, von denen sich das eine über und das andere unter dem zu untersuchenden Objekt befindet. Schnitte, die bei normaler Lichtmikroskopie zu kontrastarm sind, lassen sich bei Anwendung des INKO-Verfahrens soweit kontrastieren, daß unterschiedliche Strukturen deutlich sichtbar werden.

## Dauerpräparate:

Um mikroskopische Präparate über Jahre aufbewahren zu können, fertigt man Dauerpräparate an. Dazu werden Hand- und Mikrotomschnitte mit Einschlußmedien behandelt.

## Wasserlösliche Einschlußmittel:

### Glycerin-Gelatine:

10 g Gelatine(für die Mikrobiologie "MERCK" Art. 4070) läßt man sechs Stunden in 40 ml Wasser quellen. Das entstandene Gel wird mit 50 ml Glycerin und 1 g Phenol versetzt und unter Umrühren bei 45°C auf dem Wasserbad erhitzt, bis keine Gelatineflöckchen mehr in der Lösung wahrnehmbar sind. Nach dem Abkühlen und Erstarren ist die Glycerin-Gelatine gebrauchsfertig. Zum Einschließen der Objekte wird ein kleines Blöckchen Glycerin-Gelatine auf einen Objektträger gegeben und der Schnitt mit Pinzette und Präpariernadel auf das Blöckchen aufgebracht. Das Ganze wird mit einem Deckglas bedeckt und über der Sparflamme des Bunsenbrenners erhitzt, bis sich die Glycerin-Gelatine verflüssigt hat.

Das Verfahren ist nur für Handschnitte geeignet, weil das Erhitzen empfindliches Gewebe schrumpfen läßt.

### Polyvinylalkohol:

2 g Polyvinylalkohol (SERVA Feinbiochemika, PVA 48/20, MG 90000) wird mit 7 ml Aceton zu einer homogenen Paste verrieben; dem Gemisch werden 5 ml Wasser, 5 ml Glycerin und 5 ml Milchsäure zugesetzt, zuletzt werden noch 5 ml Wasser tropfenweise zugegeben. Man erhält eine stark getrübbte Lösung, die ca. 10 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt wird, bis sie vollkommen klar geworden ist. Die Objekte werden in einige Tropfen dieser Lösung eingeschlossen. Nach 24 Stunden hat sich das Einschlußmedium verfestigt.

Polyvinylalkohol hat einen noch niedrigeren Brechungsindex als Glycerin-Gelatine und eignet sich daher besser zur Beobachtung feiner Strukturen. Sein Nachteil ist, daß es Färbungen ausbleichen läßt.

# Wasserunlösliche Einschlußmittel:

Entellan<sup>®</sup> "MERCK" ist ein gebrauchsfertiges Schnelleinschlußmittel. Objekte, die mit Entellan<sup>®</sup> eingeschlossen werden sollen, müssen mit einem Zwischenmedium behandelt werden, in dem Entellan<sup>®</sup> löslich ist (Xylol, Isopropanol, Benzol u.ä.). Die Objekte werden mit reichlich Entellan<sup>®</sup> eingeschlossen, da während des Trocknungsvorganges eine starke Volumenminderung eintritt. Entellan<sup>®</sup> wird innerhalb von 20 Minuten fest, es hat den gleichen Brechungsindex wie Glas und Färbungen bleichen nicht aus. Entellan<sup>®</sup> verändert sich nicht unter Sonnen- und UV-Bestrahlung; ferner kann es zu Fluoreszenzuntersuchungen benutzt werden, da es keine Eigenfluoreszenz besitzt.

## 6.7. Abbildungen

### Zeichnungen:

Zeichnungen von Mikroskopbildern werden mit Hilfe eines LEITZ-Zeichengerätes angefertigt. Dieses Gerät funktioniert nach dem Mischbildverfahren: dabei wird eine beleuchtete Zeichenfläche neben dem Mikroskop über einen Spiegel und ein Strahlenteilerprisma in der Okularebene abgebildet; Zeichenfläche und Mikroskopbild werden gleichzeitig im Mikroskop sichtbar.

### Mikrophotographien:

Mikrophotographien wurden sowohl von Lichtmikroskopbildern aufgenommen als auch von Mikroskopbildern nach dem INKO-Verfahren; im ersten Fall wurden Schwarzweiß- und Farbaufnahmen gemacht mit einer automatischen Mikroskop-Kamera-Anlage (Orthomat W "LEITZ"). Im zweiten Fall wurden ZEISS-Geräte benutzt: Mikroskop mit Objektiv Planachromat 40/Kondensorstellung II und eine Kamera mit Handauslöser. Es wurden nur Schwarzweiß-Aufnahmen gemacht. Als Filmmaterial diente für Schwarzweiß-Aufnahmen: AGFAORTHO 25 professional, für Farbaufnahmen: AGFACHROME 50 L professional, 3100°K.

## 7. Zusammenfassung

Obwohl *Papaver somniferum* L. zu den ältesten und zu den sehr gut untersuchten Arzneipflanzen gehört, bleiben doch immer noch Teilgebiete zu erforschen; sei es, daß sich neue Möglichkeiten ergeben, in den Feinbau des Pflanzengewebes oder der Zelle vorzudringen durch die Weiterentwicklung von Präzisionsinstrumenten und Analysenmethoden, oder sei es, daß durch vorangegangene Arbeiten der Blick auf Probleme freigelegt wurde, die bis dahin noch nicht in Angriff genommen waren. Die vorliegende Arbeit berücksichtigt im wesentlichen drei verschiedene Teilgebiete:

- a) Die Entwicklung der Milchröhren in der Sproßachse von *Papaver somniferum* im Verlauf einer Vegetationsperiode
- b) Die phytochemische Untersuchung der einzelnen Laubblätter von *Papaver somniferum* im Verlauf einer Vegetationsperiode in bezug auf die Hauptalkaloide Morphin, Codein, Papaverin und Noscapin
- c) Die Erläuterung und Klärung der Frage, ob die Anwesenheit von Alkaloiden bei *Papaver somniferum* auf das Milchröhrensystem beschränkt ist

zu a)

Die besonderen Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Milchröhren von *Papaver somniferum* liegen darin, daß das Milchröhrensystem gegenüber mechanischen Einflüssen sehr empfindlich ist, z. B. kollabiert es bei der jungen Pflanze schon beim Schneiden, und daß die Milchröhren im Mikroskopbild nur schwer sichtbar zu machen sind auf Grund ihrer Lage zwischen Siebröhren und Sklerenchymfasern im Pflanzengewebe.

Es konnten jedoch sowohl zum Schneiden des Pflanzenmaterials als auch zur ausreichenden Kontrastierung des Mikroskopbildes gute Verfahren ausfindig gemacht werden. So lassen sich empfindliche Pflanzenteile schonend mittels Gefriermikrotomie schneiden, und eine deutliche Hervorhebung und Sichtbarmachung des Milchröhrensystems gegenüber dem umgebenden Gewebe erhält man durch Interferenz-Kontrast-Mikroskopie bei sehr dünnen Schnitten und bei dickeren Schnitten durch ein spezielles Färbeverfahren.

Mit der Anwendung dieser Methoden hat man die Möglichkeit, die Entwicklung der Milchröhren vom Keimlingsstadium an während der gesamten Vegetationsperiode zu verfolgen und danach ergibt sich folgendes Bild:

Die Milchröhren entwickeln sich aus Lagen schmaler, tangential gestreckter Zellen, die im Leitbündel an die Gefäße angrenzen; neben den Milchröhren werden aus diesen Zelllagen auch Siebröhren und Sklerenchymfasern differenziert. Durch teilweises Auflösen und Auseinanderweichen der Längswände der Milchröhren entsteht ein Netzwerk fusionierender Röhren, deren Durchmesser und Zellwandstärke im Laufe der Vegetationsperiode bis zur Blütezeit noch zunehmen.

zu b)

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung des Alkaloidgehalts der Laubblätter wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen.

Die quantitative Gehaltsbestimmung erfolgte durch Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen mittels eines Spektrodensitometers (SCHOEFFEL INSTRUMENT GmH, 2351 Trappenkamp). Im Verlauf der Vegetationsperiode ergab sich für die einzelnen Alkaloide folgendes Bild:

#### Für Morphin:

Morphin ist vom Keimlingsstadium an während der ganzen Vegetationsperiode in den Blättern enthalten. In den Folgeblättern können jedoch keine jahreszeitlichen oder andersgearteten, periodischen Schwankungen im Gehalt festgestellt werden.

#### Für Codein:

Codein -obwohl unmittelbare, biogenetische Vorstufe von Morphin- ist nicht vor der sechsten Woche der Vegetationsperiode in den Blättern nachzuweisen. Danach ist der Gehalt in gut entwickelten Folgeblättern nahezu konstant, es sind allerdings nur geringe Mengen vorhanden. Mit zunehmender Kapselreife steigt der Gehalt in den jungen Folgeblättern noch einmal an.

#### Papaverin:

Papaverin ist wie Morphin während der gesamten Vegetationsperiode in den Blättern enthalten, anfangs in geringen Mengen. In gut entwickelten Folgeblättern steigt der Gehalt zur Blütezeit an.

#### Noscapin:

Noscapin ist am Anfang der Vegetationsperiode (1. Woche) in Keim- und Primärblättern nachzuweisen, danach sinkt der Gehalt unter die Nachweisgrenze ab und Noscapin tritt erst wieder zum Zeitpunkt des Schossens in den Laubblättern auf. Zur Blütezeit hat Noscapin in allen gut entwickelten Laubblättern ein Maximum.

zu c)

Vieles deutet darauf hin, daß die Anwesenheit der Alkaloide in *Papaver somniferum* nicht allein auf das Milchröhrensystem beschränkt ist:

Es sind Alkaloide nachgewiesen worden in Pflanzenteilen, die keine Milchröhren führen: den Samen und den Staubblättern (23). FAIRBAIRN und EL-MASRY (14,15 ) verfolgten den Weg von radioaktiv markiertem Morphin und dessen Metaboliten in verschiedenen Teilen der Pflanze: außer im Milchsaft, im Perikarp, im Embryo und im Samen; in diesen Pflanzenteilen wurden teils die Alkaloide selber, teils alkaloidähnliche Substanzen -"bound alkaloids"- nachgewiesen.

Da zu einem bestimmten Zeitpunkt Blattläuse, die als Siebröhrenausbeuter gelten, Pflanzen von *Papaver somniferum* befielen, untersuchte ich die Blattläuse auf Anwesenheit von Alkaloiden und stellte fest, daß die Tiere aus der Pflanze Alkaloide aufgenommen hatten. Blattläuse auf Pflanzenmaterial des Schlafmohns wurde daraufhin mikroskopisch untersucht, um festzustellen, aus welchem Bereich in der Pflanze die Tiere ihre Nahrung aufnahmen, ob sie also tatsächlich nur Siebröhren ausbeuteten oder auch andere Nahrungsquellen, wie z.B. die Milchröhren, deren Latex u.a. Proteine und Lipide enthält.

Es zeigte sich, daß die Blattläuse ausschließlich Siebröhren ausbeuteten; sie hatten also die Alkaloide aus dem Siebröhreninhalt aufgenommen. Aus der Art, wie die Blattläuse ihre Saugrüssel in der Pflanze bewegen, ging eindeutig hervor, daß die Alkaloide nicht aus anderen Elementen des Pflanzengewebes stammen konnten. Aus dieser Untersuchung läßt sich schließen, daß neben den Milchröhren auch andere, unterschiedlich differenzierte Zelltypen in der Lage sind Alkaloide zu bilden und/oder zu transportieren und/oder zu speichern.

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) TSCHIRCH, Handbuch der Pharmakognosie, Spezielle Pharmakognosie, Bd. III 1, 595  
Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig (1923)
- (2) HEEGER, E.F., POETHKE, W., Papaver somniferum L.,  
Der Mohn, Anbau, Chemie, Verwendung  
Die Pharmazie, 4. Beiheft/1, Ergänzungsband;  
2. Auflage (1948)
- (3) KERBOSCH, M.G.J.M., Bildung und Verbreitung einiger  
Alkaloide in Papaver somniferum L.  
Archiv der Pharmazie, 248, 536 (1910)
- (4) POETHKE, W., ARNOLD, E., Untersuchungen über den  
Morphingehalt der Mohnpflanze  
Die Pharmazie, 6, 406 (1951)
- (5) PFEIFER, S., Über die quantitative Erfassung der  
wichtigsten Mohnalkaloide im Mikromaßstab  
Die Pharmazie, 13, 100 (1958)
- (6) TETENYI, P., LÖRINCZ, C., SZABO, E., Untersuchung der  
intraspezifischen Differenzen bei Mohn  
Beiträge zur Charakterisierung der Hybriden von  
Papaver somniferum L. x Papaver orientale L.  
Die Pharmazie, 16, 426 (1961)
- (7) PFEIFER, S., HEYDENREICH, K., Über das Alkaloidspektrum  
keimender Mohnpflanzen  
Naturwissenschaften, 48, 222 (1961)

- (8) NEUBAUER, P., Zum Auftreten der wichtigsten Alkaloide des Mohns in den einzelnen Organen und in verschiedenen Entwicklungsstadien  
Planta Medica, 12, 43 (1964)
- (9) PFEIFER, S., Über die Alkaloide der Gattung Papaver  
Pharmazeutische Zeitung, 111, 463 (1966)
- (10) PFEIFER, S., Papier- und dünn-schichtchromatographische Charakterisierung von Alkaloiden der Gattung Papaver  
Journal of Chromatography, 24, 364 (1966)
- (11) PFEIFER, S., Über Alkaloide der Gattung Papaver  
31. Mitteilung. Dünnschichtchromatographische Charakterisierung von Alkaloiden der Gattung Papaver  
Journal of Chromatography, 41, 127 (1969)
- (12) PFEIFER, S., Neue Papaveralkaloide  
Die Pharmazie, 26, 328 (1971)
- (13) FAIRBAIRN, J.W., KAPOOR, L.D., The Laticiferous Vessels Of Papaver Somniferum L.  
Planta Medica, 8, 49 (1960)
- (14) FAIRBAIRN, J.W., EL-MASRY, S., The Alkaloids Of Papaver Somniferum  
V. Fate of the "end-product" alkaloid morphine  
Phytochemistry, 6, 499 (1967)
- (15) FAIRBAIRN, J.W., EL-MASRY, S., The Alkaloids Of Papaver Somniferum  
VI. "bound morphine" and seed development  
Phytochemistry, 7, 181 (1968)

- (16) FAIRBAIRN, J.W., DJOTÉ, M., Alkaloid Biosynthesis And Metabolism In An Organelle Fraction In *Papaver Somniferum*  
Phytochemistry, 9, 739 (1970)
- (17) ANTOUN, M.D., ROBERTS, M.F., Some Enzymes Of General Metabolism In The Latex Of *Papaver Somniferum*  
Phytochemistry, 14, 909 (1975)  
  
Phosphatases In The Latex Of *Papaver Somniferum*  
Phytochemistry, 14, 1275 (1975)
- (18) ANTOUN, M.D., ROBERTS, M.F., Enzymic Studies With *Papaver Somniferum*  
5. The Occurrence of Methyltransferase Enzymes in Poppy Latex  
*Planta Medica*, 28, 6 (1975)
- (19) ESAU, K., Pflanzenanatomie,  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1969)
- (20) GYÉRESI, Á., RÁCZ, G., Neues Fließmittel zur Trennung der Hauptalkaloide des Opiums  
*Die Pharmazie*, 28, 271 (1973)
- (21) ZIEGLER, H., Der Ferntransport organischer Stoffe in den Pflanzen  
*Die Naturwissenschaften*, 6, 177 (1963)
- (22) PREININGER, V., TOSNAROVÁ, V., SANTAVÝ, F., Isolierung und Chemie der Alkaloide der Gattung *Papaver* LV.  
Isolierung der Alkaloide und chemotaxonomische Auswertung der Pflanzen *Papaver glaucum* BOISS. et HAUSSKN., *P. tauriculum* BOISS., *P. fugax* POIR. und *P. heldreichii* BOISS.  
*Planta Medica*, 20, 70 (1971)

- (23) EL-KHEIR, Y.M., The Alkaloids Of The Stamens Of  
Papaver Somniferum  
Planta Medica, 27, 275 (1975)
- (24) STAHL, E., SCHMITT, W., TAS-Verfahren und Thermo=  
fraktographie zur Schnellanalyse von Alkaloiddrogen  
Archiv der Pharmazie, 308, 570 (1975)
- (25) WIMALARATNA, S.D., A Staining Procedure For Latex  
Vessels Of Hevea  
Stain Technologie, September, 219 (1973)
- (26) ZACH, in GERLACH , D., Botanische Mikrotechnik,  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1969)

## LEBENS LAUF

Am 5. Oktober 1947 wurde ich als zweites von vier Kindern des Wolfgang Jupe und seiner Frau Erika, geb. Bonitz, in Gronau (Kreis Alfeld) geboren.

Von Ostern 1954-1958 besuchte ich die katholische Volksschule in Bramsche (Kreis Bersenbrück), an der mein Vater Volksschullehrer war.

Im Dezember 1957 bestand ich am Mädchengymnasium der Ursulinen in Osnabrück die Aufnahmeprüfung.

1958 zogen wir nach Bonn-Bad Godesberg, weil mein Vater den Beruf gewechselt hatte, Offizier der Bundeswehr geworden war und in Bonn arbeitete. Von Ostern 1958 an besuchte ich das Neusprachliche Mädchengymnasium Clara-Fey-Schule in Bonn-Bad Godesberg. Von August 1959 bis April 1960 wurde meine Schulzeit durch einen Auslandsaufenthalt unterbrochen. Im Rahmen seiner Bundeswehrtätigkeit wurde mein Vater nach El-Paso, Texas, USA versetzt; während dieser Zeit besuchte ich die Magoffin-Lee-Junior High School.

Im Sommer 1967 bestand ich an der Clara-Fey-Schule in Bonn-Bad Godesberg das Abitur.

Vom September 1967 -1969 leistete ich das vorgeschriebene Praktikum in der Lindenapotheke in St. Augustin-Mülldorf und bestand das Vorexamen am 11. September in Köln.

Seit dem Sommersemester 1970 studiere ich an der Philipps-Universität, Marburg, Pharmazie, wo ich am 12. Dezember 1973 das Staatsexamen bestand. 1974 begann ich am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Wichtl die vorliegende Doktorarbeit, die ich im Sommer 1977 beendete.







